

Aus der Augenklinik im Klinikum Steglitz der
Freien Universität Berlin
geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. Tiburtius

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNG ÜBER DIE VERTEILUNG
IMMUNHISTOCHEMISCH MARKIERTEN
TYP IV-COLLAGENS IN DER
MENSCHLICHEN DESCMET'SCHEN MEMBRAN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Kern
aus Berlin

1984

Aus der Augenklinik im Klinikum Steglitz der
Freien Universität Berlin
geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. Tiburtius

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung
über die Verteilung immunhistochemisch markierten
Typ IV-Collagens in der menschlichen
Descemet'schen Membran

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Kern
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H. Tiburtius

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Stolpmann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13.07.1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1..... <u>EINLEITUNG</u>	7
1.1... DESCOMET'SCHE MEMBRAN.....	7
1.1.1. Funktion.....	7
1.1.2. Struktur.....	9
1.1.3. Komponenten.....	11
1.2... COLLAGEN.....	12
1.2.1. Typisierung.....	12
1.2.2. Typ IV-Collagen.....	15
2..... <u>MATERIAL</u>	18
2.1... UNTERSUCHTES MATERIAL.....	18
2.2... GERÄTE.....	18
2.3... PUFFERLÖSUNGEN.....	18
2.4... KUNSTSTOFF.....	19
2.5... CHEMIKALIEN.....	19
2.6... SONSTIGE MATERIALIEN.....	19
3..... <u>METHODE</u>	20
3.1... PAP-METHODE.....	20
3.2... EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG.....	23
3.2.1. Immunhistochemie.....	23
3.2.2. Kunststoff-Einbettung.....	27
3.2.3. Ultradünnschnitt.....	29
3.2.4. Elektronenmikroskopie.....	32
4..... <u>ERGEBNISSE</u>	32
4.1... LICHTMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE.....	32
4.2... ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE.....	34
5..... <u>DISKUSSION</u>	44
6..... <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	49
..... Literaturverzeichnis.....	50

1. EINLEITUNG

1.1. THEMA UND ZIEL

1.1.1. Zielsetzung

Das Ziel dieses Projekts ist es, die Auswirkungen der Digitalisierung auf die Arbeitswelt zu untersuchen. Insbesondere soll die Rolle von Künstlicher Intelligenz (KI) und Automatisierung in der Produktion und Dienstleistungswirtschaft analysiert werden. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Chancen und Risiken der Digitalisierung zu verstehen und entsprechende Maßnahmen zu entwickeln.

Das Projekt wird in drei Phasen unterteilt:

- 1. Literaturrecherche und Bestimmung des Forschungsstandes
- 2. Erhebung von Daten und Interviews mit Experten
- 3. Analyse der Ergebnisse und Formulierung von Empfehlungen

Die Ergebnisse des Projekts werden in einer Abschlussarbeit zusammengefasst und in Form von Berichten und Präsentationen kommuniziert.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

MEINEN ELTERN

Am 1. September 2023 wurde das Projekt "Die Auswirkungen der Digitalisierung auf die Arbeitswelt" offiziell gestartet. In der ersten Phase wurde der Forschungsstand zu diesem Thema untersucht.

In der zweiten Phase wurden Daten erhoben und Interviews mit Experten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Phase werden in der nächsten Phase analysiert.

Die Ergebnisse der Analyse werden in der nächsten Phase zusammengefasst und in Form von Berichten und Präsentationen kommuniziert.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

Die Projektarbeit wird in regelmäßigen Meetings mit dem Betreuer besprochen und überwacht.

1. EINLEITUNG

1.1. DESCOMET'SCHE MEMBRAN

1.1.1. Funktion

Die Descemet'sche Membran der Hornhaut des Auges bildet die posteriore Begrenzung des Stromas und ist Trägerstruktur für das einschichtige Endothel (Abb. 1). Benannt wurde die Descemet'sche Membran nach dem Pariser Arzt und Botaniker Jean Descemet, der sie 1758 in seiner Dissertation beschrieb (Duke-Elder und Wybar, 1961).

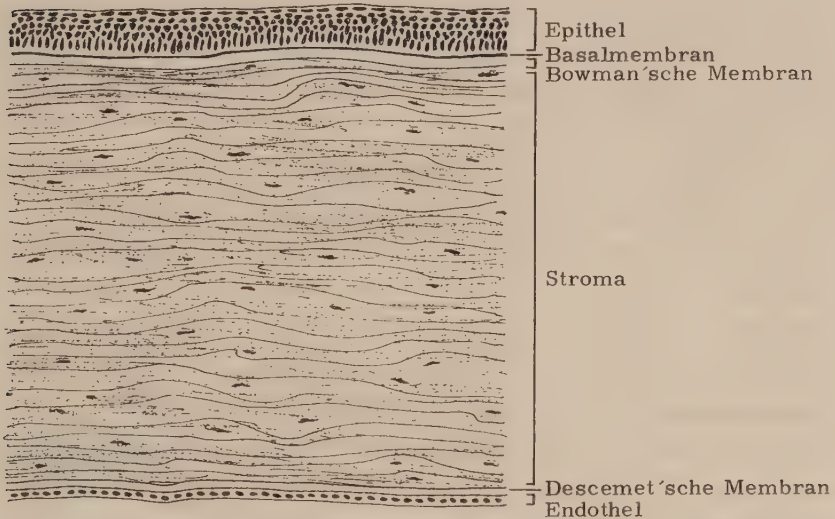


Abb. 1. Sagittaler Schnitt durch den zentralen Teil der Hornhaut eines erwachsenen, menschlichen Auges. Dargestellt ist die typische Schichtung aus mehrschichtigem Epithel, epithelialer Basalmembran, Bowman'scher Membran, Stroma, Descemet'scher Membran (endotheliale Basalmembran) und einschichtigem Endothel. - Zeichnung nach lichtmikroskopischem Präparat (x 100).

Die Descemet'sche Membran nimmt unter den Basalmembranen eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zur Bowman'schen Membran, die unter der epithelialen Basalmembran liegt, ist die Descemet'sche Membran elastisch

und läßt sich leichter vom Stroma lösen (Grayson, 1979). Bei pathologischen Prozessen bildet sie eine sehr widerstandsfähige Barriere, die in einigen Fällen die Perforation der Hornhaut verhindert. Dabei kann sich die Descemet'sche Membran als Descemetocoele vorwölben.

Neben dieser speziellen Eigenschaft erfüllt sie die typische Basalmembranen-Funktion eines semipermeablen Filters für Moleküle, die die Hornhaut passieren (Grayson, 1979).

Die Descemet'sche Membran reagiert auf pathologische Reize in unterschiedlicher Weise. Generell ist sie zur vollständigen Regeneration fähig. Eine Reihe verschiedener Verletzungen und Erkrankungen kann zu Veränderungen ihrer Struktur führen.

Eine mögliche Veränderung ist die Bildung von Falten als Folge eines hypotonen Bulbus. Sie finden sich z. B. bei Traumen (mechanische Irritation, Perforation), interstitieller Keratitis (Herpes-Infektion) (Duke-Elder und Leigh, 1965; Schreck, 1980).

Da die Descemet'sche Membran Syntheseprodukt der Endothelzellen ist, finden sich strukturelle Veränderungen als Begleitung pathologischer Endothelprozesse. Das Endothel kann z. B. bei chronischer Iridozyklitis, idiopathischer Irisatrophie und congenitalem Glaukom bis zur völligen Auskleidung der Vorderkammer proliferieren. Dabei kann es ektope Membranen bilden, die jenseits der normalen anatomischen Grenze der Descemet'schen Membran nachweisbar sind (Grayson, 1979).

Ein weiteres pathologisches Syntheseprodukt der Endothelzellen ist die "retrocorneal fibrous layer", eine collagene Schicht zwischen Endothel und Descemet'scher Membran. Sie findet sich z. B. bei congenitaler hereditärer cornealer Dystrophie, Fuchs'scher Dystrophie, polymorpher posteriorer Degeneration, maculärer cornealer Dystrophie, Keratitis, Uveitis, Verätzung, Perforation und Operation (Keratoplastik). Elektronenmikroskopisch lassen sich verschiedene Schicht-Typen unterscheiden. Dabei sind im Gegensatz zur Descemet'schen Membran auch ausgeprägte, fibrilläre Strukturen nachweisbar (Waring, 1982).

In Begleitung einiger Grunderkrankungen lagern sich in die Descemet'sche Membran Metalle ein. So findet sich z. B. bei der Wilson-Krankheit eine

Kupfereinlagerung im peripheren Bereich der Descemet'schen Membran. Es resultiert das bekannte, klinische Bild des Kayser-Fleischer-Rings. Dagegen findet sich bei Argyrose eine diffuse Einlagerung von Silber ohne Bevorzugung bestimmter Bereiche (Grayson, 1979).

1.1.2. Struktur

Lichtmikroskopisch stellt sich die Descemet'sche Membran als PAS-positives, homogenes, zellfreies Band dar, das peripher an der Schwalb'schen Linie endet. Der sagittale Durchmesser beträgt im zentralen Bereich beim Erwachsenen ca. $6\mu\text{m}$, in der Peripherie ca. $9\mu\text{m}$ und nimmt im Laufe des Lebens bis auf $20-30\mu\text{m}$ zu (Duke-Elder und Wybar, 1961).

Elektronenmikroskopisch unterscheidet sich die Descemet'sche Membran wesentlich von anderen Basalmembranen. Allgemein bestehen Basalmembranen aus einer Drei-Schichten-Struktur aus lamina rara (lucida), lamina densa und retikularis Schicht (Abb. 2/ Duance et al., 1982). Einige Autoren verstehen unter Basalmembranen jedoch nur die elektronendichte, homogene lamina densa (Kefalides et al., 1979).



Abb. 2. Schematische Darstellung der typischen, elektronenmikroskopisch nachweisbaren Schichten in Basalmembranen (z. B. in der "epidermal-dermal junction"). Die Schichten werden lamina rara (lucida), lamina densa und retikularis genannt. - Zeichnung nach Kefalides et al., 1979.

Die typische Dreischichtung der Basalmembranen läßt sich in der Descemet'schen Membran nicht nachweisen. Sie stellt sich als gleichförmiges Band mit zwei unterschiedlichen Anteilen dar. Im anterioren, stromanahen Drittel der Descemet'schen Membran findet sich elektronendichtes Material in relativ regelmäßiger Ordnung. Die posteriore Drittel zeigen eine amorphe, feingranuläre Struktur (Abb. 3 / Jakus, 1964; Waring, 1982).



Abb. 3. Sagittaler Schnitt durch die Descemet'sche Membran einer normalen menschlichen Hornhaut. Im anterioren Anteil findet sich geordnetes, elektronendichtes Material. Der posteriore Anteil zeigt eine amorphe, feingranuläre Struktur. - Zeichnung nach elektronenmikroskopischem Präparat ($\times 5.000$).

Die Struktur der Descemet'schen Membran stellt sich bei verschiedenen Species völlig unterschiedlich dar. Während sie beim Menschen einen geordneten und einen amorphen Anteil aufweist, zeigt sie bei einigen Species in keinem Bereich eine reguläre Ordnung. In der Descemet'schen Membran von Rindern ist im Gegensatz dazu in der gesamten Breite eine hochgeordnete Struktur nachweisbar. Im tangentialen Schnitt zeigt sich ein Netzwerk aus hexagonalen Elementen (Jakus, 1964). In einer neuen Arbeit konnte diese Struktur verifiziert werden. Danach besteht das Netzwerk aus vier Komponenten. Zu ihnen gehört (1) eine runde, non-collagene Struktur, (2) eine

stabförmige, collagene Struktur, (3) eine feine, filamentäre, collagene Struktur und (4) amorphes, non-collagenes Material. Mittels der "freeze-etch replica"-Methode wurde eine dreidimensionale Verknüpfung dieser Substrukturen zu einem hexagonalen Gitterwerk dargestellt (Abb. 4 / Sawada, 1982).

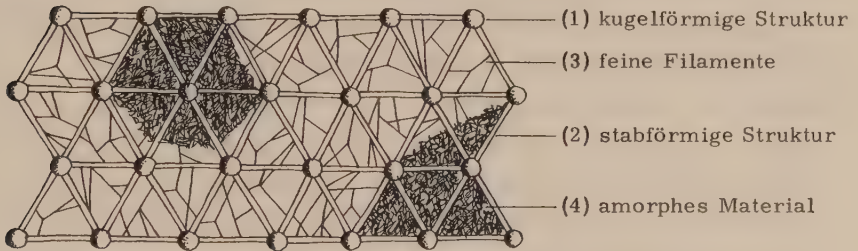


Abb. 4. Schematische Darstellung der hexagonalen Gitterstruktur in der Descemet'schen Membran von Rindern. Vier Komponenten lassen sich unterscheiden: (1) eine kugelförmige Struktur, (2) eine stabförmige Struktur, (3) feine Filamente und (4) amorphes Material. - Zeichnung nach Sawada, 1982 ($\times 100.000$).

Ein ähnliches, hexagonales Gitterwerk konnte in Basalmembranen renaler Tubuli nachgewiesen werden (Carlson et al., 1981). Folglich scheint es kein ausschließliches Merkmal der Descemet'schen Membran von Rindern zu sein.

Für die Descemet'sche Membran des Menschen gibt es bisher kein Struktur-Modell.

1.1.3. Komponenten

In Basalmembranen konnte eine Reihe verschiedener Komponenten identifiziert werden. Dazu gehören ein Heparan reiches Proteoglykan, zwei hochmolekulare Glykoproteine Fibronectin und Laminin, die Glykoproteine Entactin und "amyloid-P-component" und als collagene Komponente Typ IV Collagen. Diskutiert werden als weitere collagene Bestandteile Typ V-Col-

lagen, SC (short chained) Collagen und EC (endothelial cell) Collagen (Duance et al., 1982).

Das Proteoglykan hat ein Molekulargewicht von ca. $0.5-1 \times 10^6$ und spielt wahrscheinlich bei der Regulation der Basalmembranen-Permeabilität eine Rolle (Sage, 1982).

Fibronectin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 4.4×10^5 und kann mit spezifischen Bindungsstellen u.a. Collagen binden (Klingemann, 1982).

In der Descemet'schen Membran des Menschen scheinen Verteilungsunterschiede für Fibronectin zu bestehen (Newsome et al., 1981).

Laminin hat ein Molekulargewicht von ca. 1×10^6 und ist ubiquitärer Bestandteil der lamina lucida (Sage, 1982). Es vermittelt die Bindung von Epithel an Typ IV-Collagen (Terranova et al., 1980).

Entactin wurde kürzlich identifiziert und vermittelt wahrscheinlich wie Laminin die Zellbindung an Basalmembranen (Duance et al., 1982).

Amyloid-P-component kommt wahrscheinlich nur in endothelialen Basalmembranen vor und wird möglicherweise durch Fibronectin an Collagen gebunden (Duance et al., 1982).

Typ IV-Collagen ist bisher biochemisch (Minor, 1980) und floureszenzmikroskopisch (Sage, 1982) als Komponente gesichert. Es bildet die collagen Matrix (Timpl et al., 1981). In der menschlichen Descemet'schen Membran scheint Typ IV-Collagen unterschiedlich verteilt zu sein: Untersuchungen mit der direkten Immunofluoreszenz-Methode zeigten bevorzugt Reaktionen in anterioren und posterioren Anteilen (Newsome et al., 1981).

1. 2. COLLAGEN

1. 2. 1. Typisierung

Die Collagene gehören zu den Skleroproteinen und sind typspezifisch in Körpergeweben verteilt (Tab. 2). Collagenmoleküle bestehen aus Polypeptidketten (α -Ketten), die zu einer Superhelix verdreht sind. Die verschiedenen Collagentypen sind laut Definition Produkte verschiedener Gen-Orte. Außerdem sollte jeder Typ eine charakteristische Gewebever-

teilung aufweisen und einer Teilfunktion dienen (Bornstein, 1980). Die Collagentypen werden mit römischen Zahlen bezeichnet, die α -Ketten davor geschrieben. Collagenmoleküle können je nach α -Ketten-Komposition Dimere oder Trimere sein (Tab. 1 / Bornstein, 1980). Die α -Ketten der Dimere und der verschiedenen Collagentypen unterscheiden sich in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung.

TYP	KETTEN	KOMPOSITION
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	[$\alpha 1(I)$] $\alpha 2(I)$, [$\alpha 1(I)$] (Trimer)
II	$\alpha 1(II)$	[$\alpha 1(II)$]
III	$\alpha 1(III)$	[$\alpha 1(III)$]
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV)$	nicht gesichert
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	nicht gesichert

Tab. 1. Überblick über mögliche α -Ketten und Molekül-Kompositionen der verschiedenen Collagentypen. Die $\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$ -Ketten werden auch als A, B, C-Ketten bezeichnet. - Tabelle nach Bornstein, 1980.

TYP	GEWEBELOKALISATION
I	Interstitielles Bindegewebe: Knochen, Sehnen, Haut
II	Knorpel
III	Ähnlich wie I; nicht vorhanden in Knochen, aber deutlich nachweisbar in Blutgefäßen und fetaler Haut
IV	Basalmembranen (lamina densa)
V	Perizelluläre Matrices von Epithel- und Mesenchymzellen; Subendothelium

Tab. 2. Verteilung der Collagentypen im Gewebe. Die Typen I-III werden wegen ihrer Lokalisation als interstitielle Collagene, der Typ IV als Basalmembranen-Collagen bezeichnet. - Tabelle nach Sage, 1982).

Die α -Ketten werden als pro- α -Ketten synthetisiert und bestehen aus einem zentralen collagenen Teil mit der Strukturformel $(\text{Gly-X-Y})_n$. In diesem Aminosäuren-triplet ist Glycin obligatorisch, die Y-Position ist häufig mit 4-Hydroxyprolin besetzt. Die Anzahl "n" der triplets ist für inter-

stitielles Collagen ca. 334, für Basalmembranen-Collagen ca. 490. Das Molekulargewicht für interstitielle pro- α -Ketten beträgt ca. 154.000 (Minor, 1980), für Typ IV-Ketten wurden Werte von 170.000 bzw. 185.000 ermittelt (Tryggvason et al., 1980). Am N- und C-terminalen Ende des collagenen Peptids existieren in der pro- α -Kette non-collagene Verlängerungen in Form zusätzlicher Peptide (im N-terminalen Peptid gibt es auch collagene Anteile). Die früheste Collagen-Form und Vorform der pro- α -Kette besitzt an der N-terminalen Verlängerung ein weiteres Peptid aus ca. 100 Resten. Diese Frühform heißt prepro-Peptid (Abb. 5 / Minor, 1980).

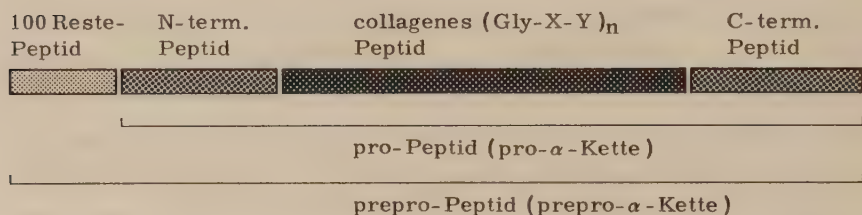


Abb. 5. Schematische Darstellung der Peptide in collagenen Frühformen. Das C-terminale Peptid spielt bei der Superhelix-Bildung eine Rolle und wird auch "registration peptide" genannt. Die interstitiellen Procollagene werden vor ihrer Organisation zu Fibrillen auf die collagenen Anteile reduziert (Minor, 1980). Das Basalmembranen-Collagen organisiert sich zur Basalmembranen-Matrix unter Beibehaltung der N- und C-terminalen, non-collagenen Peptide. Sie wurden vor kurzem als 7S, NC 1 und NC 2 Domäne identifiziert (Risteli et al., 1981; Timpl et al., 1981).

Nach Abspaltung des 100 Reste-Peptids verdrillen sich drei pro- α -Ketten intrazellulär im RER zur Superhelix. Das entstandene Polypeptid heißt Procollagen oder Tropocollagen und wird in den extra-Zellulärraum sezerniert. N- und C-Peptidasen spalten von den interstitiellen Procollagenen die Verlängerungen ab. Das entstandene Collagen organisiert sich nach Bildung einer typischen, parallelen Seit-zu-Seit und End-zu-End Versetzung spontan zu Mikrofibrillen. Die regelmäßige Versetzung innerhalb der Mikrofibrillen ist verantwortlich für die typische, elektronenmikroskopische Periodik von 60-70 nm (Minor, 1980). Die Mikrofibrillen organisieren sich zu Fibrillen, die wiederum interstitielle Collagenfasern bilden.

1. 2. 2. Typ IV-Collagen

Typ IV-Basalmembranen-Collagen unterscheidet sich wesentlich von den interstitiellen Collagen-Typen I-III :

- Die typische Periodik wird nicht beobachtet.
- Die Procollagen-Moleküle sind länger.
- Ein höherer Gehalt an hydrophoben Aminosäuren ist nachweisbar.
- Innerhalb der Superhelix bestehen Sequenz-Unterbrechungen.
- Es besteht Resistenz gegen Haut-Collagenase und Empfindlichkeit gegen bestimmte neutrale Proteasen (Sage, 1982).

Weil die für interstitielle Collagene typische Periodik nicht nachweisbar ist, stellt sich die Frage nach der Organisation der Typ IV-Moleküle in Basalmembranen. Eine Reihe möglicher Modelle wurde in Abhängigkeit von der jeweils aktuellen Vorstellung über das Typ IV-Molekül entwickelt (Kefalides, 1973; Kefalides, 1975; Kefalides et al., 1979). So haben neueste Erkenntnisse zu einem netzartigen Modell geführt, das unten beschrieben wird (Timpl et al., 1981).

Nach "limited proteolytic digestion" Behandlung von Basalmembranen wurden zwei Strukturen unterschiedlichen Molekulargewichts isoliert und "long and short form of 7S" genannt (Risteli et al., 1980; Kühn et al., 1981). Elektronenmikroskopisch zeigte sich mittels der "rotary shadowing technique", daß die 7S-Domäne (Substrukturen im Molekül werden "domain" genannt) mit vier strangförmigen Strukturen verknüpft sein konnte. Die Stränge wurden als ca. 330 nm lange, collagene Superhelices identifiziert. In den Helices wurden Sequenz-Unterbrechungen festgestellt (Schuppan et al., 1980; Glanville und Rauter, 1981). Weiter wurden kugelförmige Anteile nachgewiesen, die mit zwei Superhelices verbunden sein konnten. Sie wurden als non-collagene Domänen identifiziert und NC 1 (non collagenous domain 1) genannt. Eine weitere non-collagene Domäne wurde nachgewiesen und als NC 2 bezeichnet. Im Gegensatz zu den anderen Domänen ist ihre genaue Lokalisation im Molekül unbekannt. Wahrscheinlich liegt sie zwischen 7S-Domäne und Superhelix an der in Abb. 6 bezeichneten Stelle (Abb. 6 / Timpl et al., 1981).

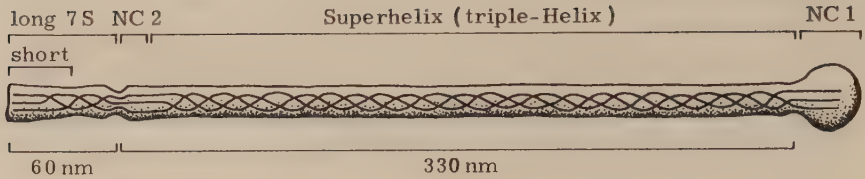


Abb. 6. Schematische Darstellung des Typ IV-Collagen-Moleküls. Neben der collagenen Superhelix sind als weitere Substrukturen die 7S-, NC 1- und NC 2-Domäne identifiziert worden. An der 7S- und NC 1-Domäne können sich die Moleküle untereinander verbinden. - Zeichnung nach Timpl et al., 1981.

Die isolierten Molekül-Fragmente und die Erkenntnisse über die Bindungsfähigkeit der Domänen bildeten die Grundlage zu einem Verknüpfungsmodell für Typ IV-Collagen. In diesem Modell sind an der 7S-Domäne vier Moleküle durch Disulfid-Brücken und andere kovalente Bindungen miteinander verknüpft. Die NC 1-Domäne verbindet zwei Moleküle miteinander. So entsteht ein netzartiger Verband, der das aktuelle Modell für die collagene Basalmembranen-Matrix darstellt (Abb. 7 / Timpl et al., 1981).

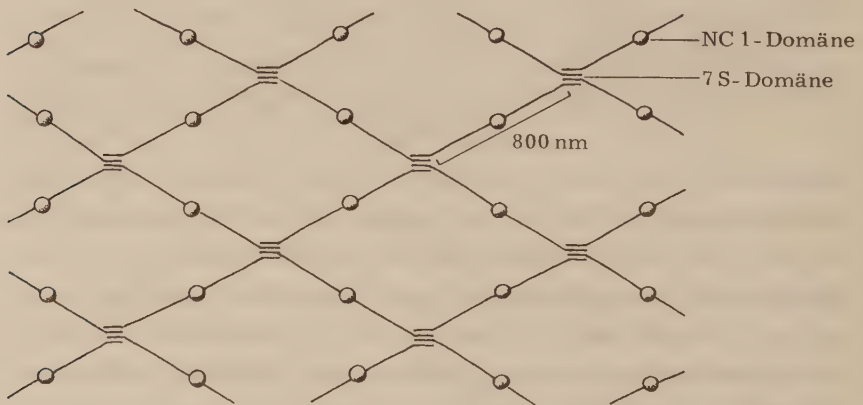


Abb. 7. Modell der netzartigen Basalmembranen-Matrix aus Typ IV-Collagen. Jeweils vier Moleküle sind an der 7S-Domäne miteinander verknüpft. An der NC 1-Domäne sind zwei Moleküle miteinander verbunden. - Zeichnung nach Timpl et al., 1981).

Basalmembranen zeichnen sich durch hohe Stabilität und Flexibilität aus. Unter physiologischen Bedingungen unterliegen sie z. B. in Blutgefäßen ständiger, mechanischer Beanspruchung bei Kontraktion und Dilatation. Auch die Descemet'sche Membran weist eine außerordentlich hohe Stabilität bei großer Flexibilität auf. Bei Einschmelzungsprozessen des Stromas ist die Descemetocèle ein deutliches Beispiel dafür (s. S. 8).

Das Netzwerk-Modell kann diese Eigenschaften durch das besondere Verhalten eines maschenartigen Verbandes (Streckung-Stauchung) bei Beanspruchung erklären. Dabei wird die Flexibilität durch die Sequenz-Unterbrechungen innerhalb der Superhelix gefördert (Timpl et al., 1981).

Für die menschliche Descemet'sche Membran gibt es bislang keine immunelektronenmikroskopische Bestätigung für das Vorhandensein von Typ IV-Collagen in der gesamten Breite. Immunhistologische Untersuchungen mit der direkten Immunofluoreszenz-Methode erbrachten Ergebnisse, die nicht in Einklang mit der allgemeinen Auffassung von einer collagenen Matrix als Grundstruktur in Basalmembranen stehen: Es ließ sich im mittleren Teil der Descemet'schen Membran stellenweise kein Typ IV-Collagen nachweisen, während anteriore und posteriore Anteile deutliche Reaktionen zeigten (Newsome et al., 1981).

Zur weiteren Untersuchung dieses Widerspruchs wäre es notwendig, eine immunhistochemische Methode anzuwenden, die die elektronenmikroskopische Darstellung von Typ IV-Collagen in der Descemet'schen Membran erlaubt. Damit ließen sich Ergebnisse erreichen, die auch in Hinblick auf die aus der Routine-Elektronenmikroskopie bekannten Strukturunterschiede zwischen geordneten und amorphen Bestandteilen (s. S. 10) interessant wären.

Mit dieser Aufgabenstellung wird in der Arbeit mittels der PAP-Methode Typ IV-Collagen in der menschlichen Descemet'schen Membran licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Lichtmikroskopie dient dazu, Reaktionsergebnisse von Typ IV-Collagen anhand von Färbezonen darzustellen. Mit der Elektronenmikroskopie werden innerhalb der Färbezonen in der Descemet'schen Membran strukturelle Verteilungsunterschiede von Typ IV-Collagen untersucht.

2. MATERIAL

Im folgenden werden die in der Arbeit verwendeten Materialien (untersuchtes Material, Geräte, Pufferlösungen, Kunststoff, Chemikalien und sonstige Materialien) jeweils etwa in Reihenfolge ihres Gebrauchs aufgelistet. Die Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad "Zur Analyse".

2.1. UNTERSUCHTES MATERIAL

15 Hornhäute von Menschen der Alterstufen sechstes bis achttes Dezenium.

2.2. GERÄTE

Kryostat ("Modell 2700/Frigocut", Jung, Nußloch), Feinwaage, Gefriertruhe, Wärmebad, Stopuhr, Lichtmikroskop, Kühlschrank, Magnetrührer, Brutschrank, Ultramikrotom ("Om U 4", Reichert, Wien), Transmissions-Elektronenmikroskop ("EM 9", Zeiss, Unterkochen).

2.3. PUFFERLÖSUNGEN

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf 1000 ml Pufferlösung :

Tris-Puffer (0.05 M/pH 7.4) :

6.06 g Trishydroxymethylamoniummethan werden mit H_2O in Lösung gebracht. Der pH-Wert wird mit rauchender HCl auf 7.4 eingestellt.

TBS (tris buffered saline ; 0.05 M/pH 7.4) :

6.06 g Trishydroxymethylamoniummethan und 9 g NaCl werden mit H_2O in Lösung gebracht. Der pH-Wert wird mit rauchender HCl auf 7.4 eingestellt.

Phosphat-Puffer (0.2 M/pH 7.6) :

14.20 g di-Natriumhydrogenphosphat und 13.61 g Kaliumhydrogenphosphat werden mit H_2O in Lösung gebracht. Der pH-Wert wird mit Kaliumhydrogenphosphat auf 7.6 eingestellt.

2. 4. KUNSTSTOFF

Für 100 g Epoxidharz werden in einem Becherglas folgende Anteile mit einem Magnetrührer bis zur Erreichung einer homogenen Bernsteinfarbe miteinander verrührt :

33.4 g	Methylnadic anhydrid (MNA)
16.6 g	Dodecenybernsteinsäure anhydrid (DDSA)
50.0 g	Epon
100.0 g + 2 % Epon-Beschleuniger	

2. 5. CHEMIKALIEN

O.C.T.-Compound (Division Miles Laboratories, Naperville), Cedukol (Merck, Darmstadt), Trishydroxymethylamoniummethan (Merck, Darmstadt), di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), aqua bidest. , HCl (rauchend), NaCl, Kälberserum (Seromed, München), Typ IV-Antikörper (wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. H.-J. Barrach zur Verfügung gestellt), goat-anti-rabbit-Antikörper (Cappel Laboratories, Cochranville), Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Komplexe (Cappel Laboratories, Cochranville), 3, 3'-Diaminobenzidin (DAB) (Ferak, Berlin), H_2O_2 , Äthylalkohol, Eukitt (Kindler, Freiburg), Osmium (VIII)-oxid (Merck, Darmstadt), Methylnadic anhydrid (Serva, Heidelberg), Dodecenybernsteinsäure anhydrid (Serva, Heidelberg), Epon (Serva, Heidelberg), Epon-Beschleuniger (Serva, Heidelberg), Propylenoxid (Merck, Darmstadt)

2. 6. SONSTIGE MATERIALIEN

Scheren, Pinzetten, Hornhaut-Trepan, Rasierklingen, Thermanox-Objektträger (Lux Scientific Corporation, Newbury Park), Glasobjektträger, Metallklammern, Färbeküvetten, Papiertücher, Kunststoffwannen, Glaschienen, Pipetten, Meßzylinder, Bechergläser, Erlenmeyer-Kolben, Aluminiumfolie, Trichter, Papierfilter, Kunststoffspritzen.

3. METHODE

3. 1. PAP-METHODE

Typ IV-Collagen wird mittels immunhistochemischer Behandlung in der Descemet'schen Membran licht- und elektronenmikroskopisch nachweisbar. Dazu wird in dieser Arbeit die Drei-Schritt-PAP (Peroxidase-Antiperoxidase)-Methode angewendet. Im ersten Schritt reagiert ein Erstantikörper mit dem Typ IV-Gewebeantigen (Abb. 8). Hierfür wird ein Antikörper benutzt, der in Kaninchen erzeugt wurde und gegen Typ IV-Collagen aus menschlicher Placenta gerichtet ist. Der Erstantikörper wird im zweiten Schritt mit einem Zweitantikörper markiert, der in Ziegen erzeugt wurde und gegen Kaninchen IgG gerichtet ist (Abb. 9). Entsprechend seiner Funktion wird er auch "link"-Antikörper genannt. Im dritten Schritt reagiert der Zweitantikörper mit dem PAP-Komplex (Abb. 10). Auf diese Weise wird das zu untersuchende Typ IV-Antigen "indirekt" mit dem PAP-Komplex (Abb. 11).

Die PAP-Methode ist empfindlicher als die sog. direkte Methode, bei der der Erstantikörper gleich mit der Peroxidase gekoppelt ist. Mögliche Nachteile der direkten Methode sind ein Verlust von Antikörpern nach der Markierung mit dem Enzym und die unspezifische Umgebungsanfärbung durch freies Enzym.

Der PAP-Komplex besteht aus zwei Molekülen Antiperoxidase und drei Molekülen Peroxidase. Die Antiperoxidase ist Kaninchen IgG und stellt für den Zweitantikörper ein Antigen dar. Die Peroxidase wird in weiteren enzymatischen Reaktionen für die Licht- und Elektronenmikroskopie nachweisbar. Dazu wird H_2O_2 als Substrat für die Peroxidase benutzt und bildet mit ihr einen Komplex. DAB (Diaminobenzidin) ist Elektronendonator und bildet einen weiteren Komplex aus, der durch seine Braunfärbung die lichtmikroskopische Darstellung ermöglicht (Abb. 12). Der Komplex ist extrem unlöslich. In einer Reaktion mit Osmiumsäure bildet sich mit dem DAB-Peroxidasekomplex ein elektronendichtes Chelat. Diese Färbestufe ist für die Elektronenmikroskopie geeignet (Sternberger, 1979).

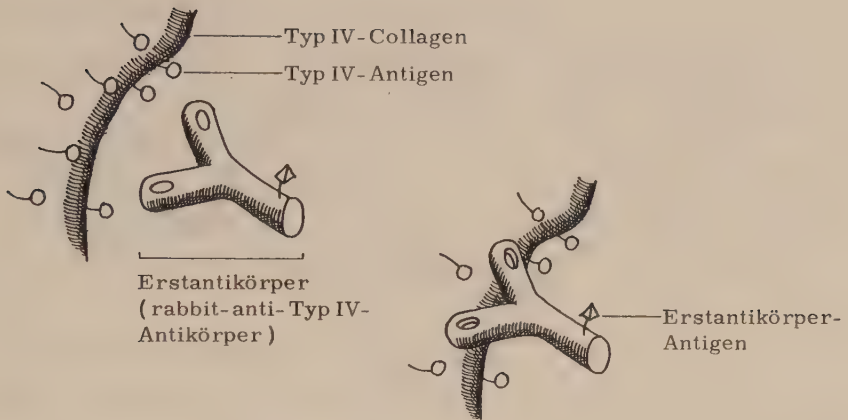


Abb. 8. Schematische Darstellung des ersten Schritts der Drei-Schritt-PAP-Methode. Der in Kaninchen erzeugte Erstantikörper (rabbit-anti-Typ IV-Antikörper) reagiert mit den antigenen Determinanten des Typ IV-Collagens in der Descemet'schen Membran der menschlichen Hornhaut.



Abb. 9. Darstellung des zweiten Schritts. Der in Ziegen erzeugte Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-Antikörper) reagiert mit der antigenen Determinante des Erstantikörpers. Nach seiner Funktion als Vermittler zwischen spezifischem Erstantikörper und PAP-Komplex wird der Zweitantikörper auch "link"-Antikörper genannt. Seine zweite Bindungsstelle bleibt unbesetzt.

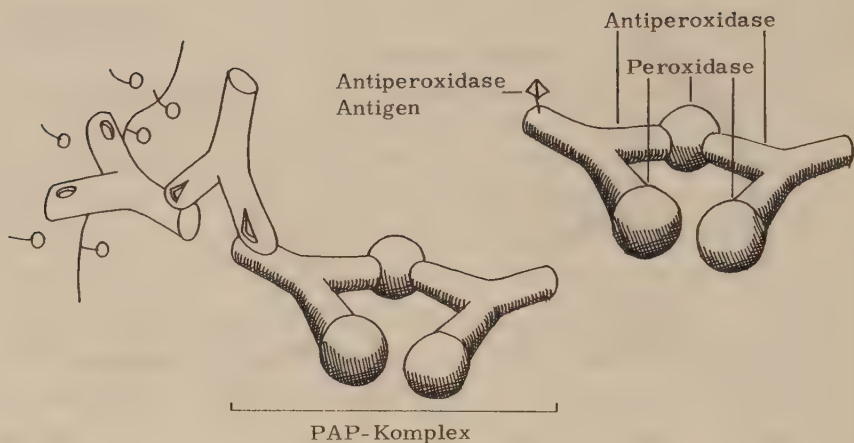


Abb. 10

Abb. 11

Abb. 10/11. Beim dritten Schritt reagiert der PAP (Peroxidase-Antiperoxidase)-Komplex mit dem Zweitantikörper. Die Antiperoxidase stammt wie der Erstantikörper von Kaninchen und bildet für den Zweitantikörper ein Antigen. Auf diese Weise wird das Typ IV-Collagen unter Vermittlung des Zweitantikörpers "indirekt" mit dem PAP-Komplex markiert. Die Peroxidase wird anschließend in zwei enzymatischen Reaktionen für die Licht- und Elektronenmikroskopie geeignet (Sternberger, 1979).

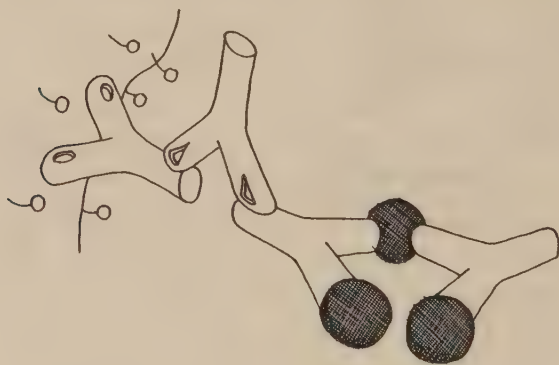


Abb. 12. Durch eine enzymatische Reaktion wird die Peroxidase für die Lichtmikroskopie geeignet. Dabei ist H_2O_2 Substrat für die Peroxidase. Beide bilden einen Komplex. Durch Zugabe von DAB (Diaminobenzidin) als weiteres Substrat und Elektronendonator entsteht ein DAB-Peroxidase-Komplex. Der Komplex ist durch seine typische Braunfärbung lichtmikroskopisch darstellbar und zeichnet sich durch seine extreme Unlöslichkeit aus.

3. 2. EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Der experimentelle Teil der Arbeit läßt sich in vier Abschnitte gliedern.
In zeitlicher Folge sind diese Abschnitte :

- 3. 2. 1. Immunhistochemie ;
- 3. 2. 2. Kunststoff-Einbettung ;
- 3. 2. 3. Ultradünnschnitt ;
- 3. 2. 4. Elektronenmikroskopie.

3. 2. 1. Immunhistochemie

Der erste Teil des Versuchs umfaßt die Vorbereitung der Hornhaut, ihren Gefrierschnitt und die immunhistochemische Behandlung mit der PAP-Methode.

Vorbereitung der Hornhaut : Die menschliche Hornhaut wird mit dem Hornhaut-Trepan ausgestanzt. Mit der Rasierklinge wird aus der ca. 8 mm durchmessenden Scheibe ein ca. 4 mm x 1 mm großer Streifen herausgeschnitten (Abb. 13).

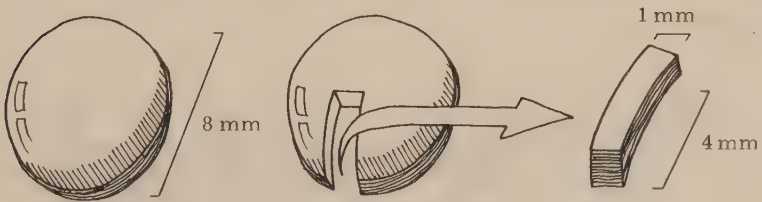


Abb. 13. Mit dem Hornhaut-Trepan wird eine ca. 8 mm durchmessende Hornhautscheibe ausgestanzt. Aus der Scheibe wird mit der Rasierklinge ein ca. 4 mm x 1 mm großer Streifen herausgeschnitten.

Gefrierschnitt: Der Streifen wird bei Zimmertemperatur in flüssiges O. C. T. -Compound eingebettet und bei -20°C tiefgefroren. Der entstandene Block wird im Gefriermikrotom (Kryostat) sagittal geschnitten. Es werden Schnitte von ca. $10\mu\text{m}$ Dicke hergestellt (Abb. 14).

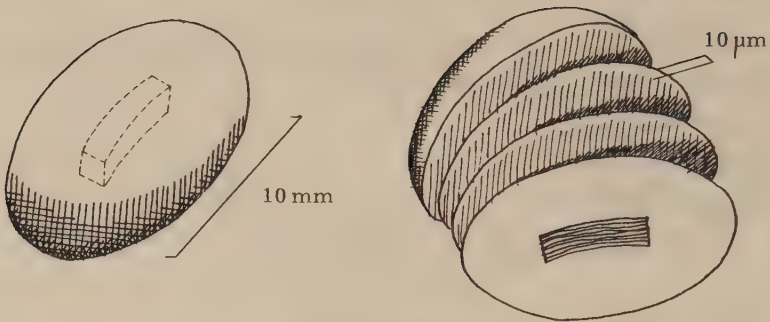


Abb. 14. Der in O. C. T. -Compound tiefgefrorene Hornhautstreifen wird im Kryostaten sagittal geschnitten. Die Schnittdicke beträgt ca. 10 μ m.

Je zwei Schnitte werden auf einen Thermanox-Objektträger aufgezogen. Durch Ritzen der Kunststoffträger werden die Präparate gekennzeichnet und numeriert. "R" steht dabei für Reaktions- und "K" für Kontrollpräparat. Die labilen Thermanox-Kunststoffträger werden mit einem Glasobjektträger unterlegt und mit einer Metallklammer befestigt (Abb. 15). Mit dieser Objektträger-Kombination wird die gesamte immunhistochemische Behandlung und ein Teil der Kunststoff-Einbettung (s. S. 26) durchgeführt.

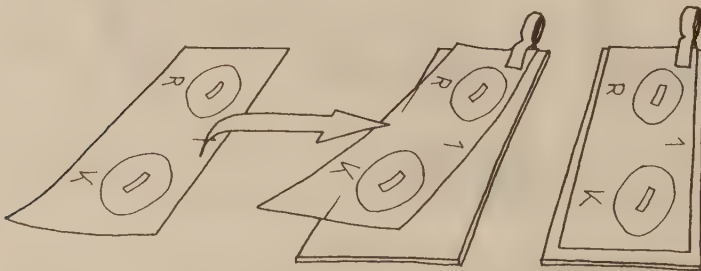


Abb. 15. Auf den Thermanox-Objektträger sind jeweils zwei Hornhautschnitte aufgezogen. Die labilen Kunststoffträger werden zur Stabilisierung mit einem Glasobjektträger unterlegt. Beide hält eine Metallklammer zusammen.

Immunhistochemische Behandlung: Die Objektträger werden mit Cedukol überzogen, um das Abschwimmen der Schnitte während der Spülphasen zu verhindern. 30 min. vor der Inkubation mit den Antikörpern kommen die Präparate in eine Färbekivette mit 0.05 M/pH 7.4 TBS. Durch Zugabe von 10 ml Kälberserum pro 1000 ml TBS sollen unspezifische Proteinadsorptionen an Oberflächen abgedeckt und damit Reaktionen an diesen Proteinen reduziert werden. Die Objektträger werden aus dem TBS genommen und mit Papiertüchern getrocknet. Anschließend werden sie auf einer Glasschiene abgelegt, die sich auf dem Boden einer flachen, verschließbaren Kunststoffwanne befindet. Die Wanne dient nach Anfeuchten des mit Filterpapier ausgelegten Bodens als Feuchte-Kammer (Abb. 16). In dieser Kammer laufen bei Zimmertemperatur die immunhistochemischen Reaktionen der PAP-Methode und die anschließenden, enzymatischen Reaktionen für die Licht- und Elektronenmikroskopie ab. Dazu werden die Schnitte mit den Substanzen für die einzelnen Reaktionsschritte betropft (Abb. 17).

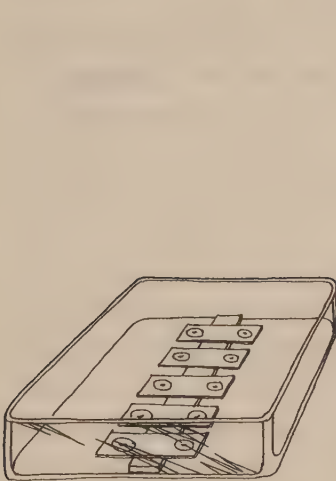


Abb. 16

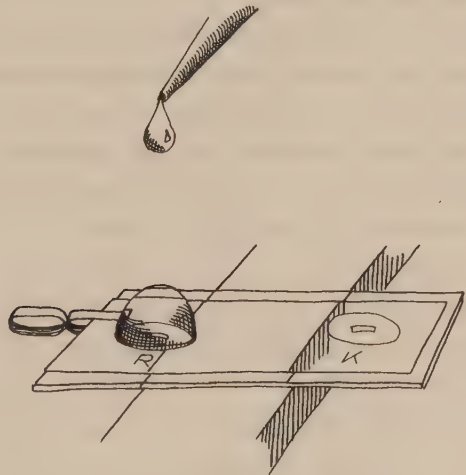


Abb. 17

Abb. 16/17. In einer flachen Kunststoffwanne werden die Präparate auf einer Glasschiene abgelegt. Die Wanne ist verschließbar und dient als Feuchte-Kammer. Darin werden die Schnitte bei Zimmertemperatur inkubiert. Die für die einzelnen Reaktionsschritte benötigten Substanzen werden aufgetropft.

Die Drei-Schritt-PAP-Methode (s. S. 20) wird mit dem Auftropfen der Erstantikörper begonnen. Die Typ IV-Collagen-Antikörper werden mit TBS im Verhältnis 1 : 25 verdünnt und mit einer Pipette auf die Reaktionspräparate (R) getropft (Abb. 17). Für die Kontrollpräparate (K) werden zwei verschiedene Verfahren der Negativkontrolle benutzt. Die eine Hälfte der Kontrollpräparate wird mit O-Serum inkubiert. Dieses Serum wurde Kaninchen, die zur Erzeugung der Antikörper gedient haben, vor der ersten Immunisierung entnommen. Das Serum wurde auf unspezifische Antikörper gegen das Typ IV-Antigen ausgetestet. Die andere Hälfte der Kontrollpräparate wird mit Typ IV-Antikörpern behandelt, die vor ihrer Verwendung für 24 Stunden mit dem Typ IV-Antigen im Überschuß inkubiert wurden. Dieses Verfahren heißt Absorptionstest.

Nach 30 min. wird die Inkubation unterbrochen. Die Präparate werden in einer Färbeküvette mit TBS gewaschen. Der Waschvorgang dauert 30 min. und soll die Antikörper von den Schnitten entfernen. Der Puffer wird zweimal gewechselt.

Anschließend werden die Objektträger abgetrocknet und in der Feuchten-Kammer mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der goat-anti-rabbit-Antikörper wird nach 1 : 30 Verdünnung mit TBS auf alle Schnitte getropft.

Nach 30 min. wird die Inkubation beendet.

Erneut werden die Präparate in der Färbeküvette mit zweimal gewechseltem TBS 30 min. lang gewaschen.

Es schließt sich als letzter Schritt der PAP-Methode die Inkubation mit dem PAP-Komplex an. Der Komplex ist mit TBS im Verhältnis 1 : 250 verdünnt und wird auf alle Präparate getropft. Nach 30 min. wird die Reaktion unterbrochen.

Es folgt der Spülvorgang für 30 min. in der Färbeküvette. Diesmal wird TBS ohne Serum verwendet.

Schon zu Beginn des Versuchs werden 75 mg DAB zu 100 ml 0,05 M/pH 7,4 Tris-Puffer in einen kleinen Erlenmeyer-Kolben gegeben, der wegen der Lichtempfindlichkeit des DAB mit Folie ummantelt ist. Das DAB wird mit einem Magnetrührer in Lösung gebracht. Nach mindestens 120 min. wird die Lösung durch einen Papierfilter in eine Färbeküvette gegeben. Die Kü-

vette mit der DAB-Lösung wird im Wärmebad auf 37°C erwärmt.

Die Präparate kommen nach dem letzten Spülbad in die Küvette mit der DAB-Lösung. Nach 15 min. werden 10 ul H_2O_2 dazugegeben. Nach wenigen Minuten beginnen sich die Präparate braun zu färben. Zu diesem Zeitpunkt müssen die Schnitte häufig aus der Lösung genommen und lichtmikroskopisch kontrolliert werden, um ein Überfärben zu verhindern. Ca. 7-10 min. nach Zugabe des H_2O_2 ist ein optimaler Färbezustand erreicht. Die Präparate werden sofort in einer Färbeküvette intensiv mit Tris-Puffer gespült. Dabei wird der Puffer in einminütigem Wechsel mindestens 6 x erneuert. Das ist erforderlich, um ein Nachfärben der Präparate zu verhindern. Bei Kühlschranktemperaturen (6°C) können die Schnitte bis zur Einbettung einige Tage gelagert werden.

3. 2. 2. Kunststoff-Einbettung

Im zweiten Teil des Versuchs werden Osmierung, Entwässerung und die Einbettung der Präparate in Kunststoff durchgeführt.

Osmierung: Die Präparate werden aus dem Tris-Puffer genommen, abgetrocknet und in die Feuchte-Kammer gelegt. Anschließend werden sie mit 2% Osmiumsäure (4% Osmiumlösung + 0.2 M/pH 7.6 Phosphat-Puffer im Verhältnis 1 : 1) betropft und 60 min. inkubiert.

Es folgt eine Spülung der Präparate in einer Färbeküvette mit 0.2 M/pH 7.6 Phosphat-Puffer für 15 min.

Entwässerung: Die Schnitte werden in aufsteigender Alkoholreihe der Stufen 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % entwässert. Der Alkohol kommt in Färbeküvetten, in denen die Schnitte bei jeder Stufe 5 min. bleiben. Die 100 %-Stufe wird 3 x wiederholt.

Ein Teil der Präparate wird nach der Entwässerung für die Lichtmikroskopie mit Eukitt eingedeckelt. Der größere Teil wird weiter für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

Kunststoff-Einbettung: Nach der Entwässerung kommen die Schnitte für 10 min. in eine Färbeküvette mit Propylenoxid. Das Propylenoxid wird 1 x gewechselt. Bei der Alkoholentwässerung und der Propylenoxidbehandlung

ist bei der Herausnahme der Präparate aus der Küvette die Austrocknung zu vermeiden.

Da der Kunststoff (Epoxidharz) auf der Basis des Propylenoxids in die Präparate penetriert, werden sie in einer aufsteigenden Kunststoffreihe mit abnehmenden Propylenoxid-Anteil behandelt.

In einer ersten Stufe kommen die Schnitte für 24 Stunden in eine Färbeküvette mit $\frac{1}{3}$ Kunststoff und $\frac{2}{3}$ Propylenoxid. Die Küvette wird wegen der hohen Flüchtigkeit des Propylenoxids dicht verschlossen.

In einer zweiten Stufe kommen die Präparate für 12 Stunden in $\frac{2}{3}$ Kunststoff und $\frac{1}{3}$ Propylenoxid. Dabei bleibt die Küvette unverschlossen, und die Kunststoffkonzentration nimmt durch die Verflüchtigung des Propylenoxids kontinuierlich zu.

In einer letzten Stufe werden die Thermanoxträger von den Glasträgern durch Abnahme der Klammer getrennt und auf einen folienumwickelten Glasstab gelegt. Auf eine Länge von ca. 2 cm abgeschnittene Spritzenenden (von 2 ml-Kunststoffspritzen) werden mit ihrer Unterfläche auf die Thermanoxträger gelegt (Abb. 18). Dabei liegen die Präparate in Röhrchenmitte. Wenige Tropfen reinen Kunststoffs werden in die Röhrchen gegeben (Abb. 19). Da noch keine feste Verklebung zwischen Spritze und Thermanox besteht, fließt der eingetropfte Kunststoff bis auf einen dünnen Film über den Präparaten wieder ab.

Während die Behandlung der Schnitte in der aufsteigenden Kunststoffreihe bei Zimmertemperatur (20°C) durchgeführt wird, findet die Polymerisation des Kunststoffs bei höheren Temperaturen statt. Dazu kommt der Glasstab mit den Thermanoxträgern und den aufgesetzten Röhrchen in den Brutschrank. Dort härtet der Kunststoff bei drei Temperaturstufen aus. Begonnen wird mit 35°C für ca. 8 Stunden. Innerhalb dieser Zeit polymerisiert der Kunststoff zwischen Spritze und Thermanoxträger. Die Röhrchen können jetzt mit Kunststoff ca. 1 cm hoch aufgefüllt werden. Innerhalb von 8 Stunden bei 45°C und anschließend 24 Stunden bei 60°C härtet der Kunststoff in den Röhrchen aus. Der Glasstab mit den Röhrchen wird dann aus dem Brutschrank genommen. Noch während der Abkühlphase wird an den Objekten weitergearbeitet.

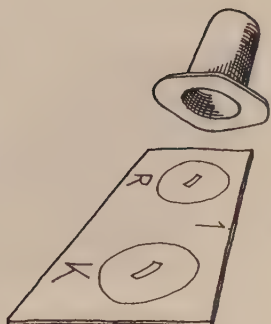


Abb. 18

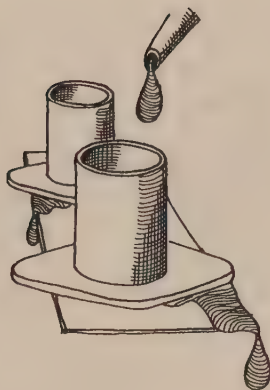


Abb. 19

Abb. 18/19. Auf die Thermanoxträger werden Endstücke von 2ml-Kunststoffspritzen aufgesetzt. Das Präparat kommt dabei etwa in Röhrchenmitte zu liegen. Um das Präparat in Kunststoff einzubetten, wird in die Röhrchen Epoxidharz getropft. Bevor eine Verklebung zwischen Spritze und Thermanox stattgefunden hat, fließt der größte Teil des Kunststoffs jedoch wieder ab. Nach der Verklebung wird das Spritzenröhrchen etwa 1 cm hoch mit Kunststoff aufgefüllt und im Brutschrank gehärtet.

3. 2. 3. Ultradünnschnitt

Im dritten Teil des Versuchs wird der Kunststoffblock vorbereitet und ultradünn geschnitten.

Blockvorbereitung: Die Thermanoxträger lassen sich leicht von dem folienumwickelten Glasstab abnehmen. Die Spritzenenden mit dem Kunststoffblock werden vorsichtig vom Thermanoxträger entfernt (Abb. 20). Die Spritzenummantelung wird längs aufgeschnitten und der Kunststoffblock herausgehoben (Abb. 21). Dicht unter der Oberfläche des um 180° gedrehten Blocks liegt das Präparat (Abb. 22).

Der Kunststoffzylinder wird in einen Schraubstock gespannt und zu einem ca. 3 x 3 x 2 mm großen Block verkleinert (Abb. 23). Das Präparat liegt dabei parallel zu den Längsseiten (Abb. 24). Adhärente Reste des Thermanoxträgers können mit der Rasierklinge vorsichtig von der Blockoberfläche abgehoben werden. Dabei wird unter der Stereo-Optik des Ultramikrotoms gearbeitet.

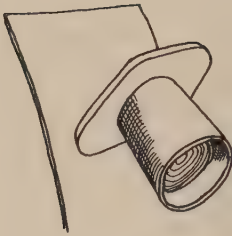


Abb. 20

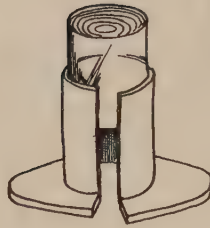


Abb. 21



Abb. 22

Abb. 20/21/22. Die Spritzenenden mit dem gehärteten Kunststoff werden vom Thermanoxträger gelöst. Die Spritzenummantelung wird längs aufgeschnitten und der Kunststoffzylinder herausgehoben. Nach Drehung des Zylinders um 180° erkennt man dicht unter der Kunststoffoberfläche die eingebettete Hornhaut.

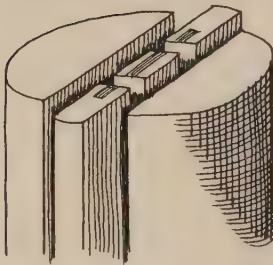


Abb. 23

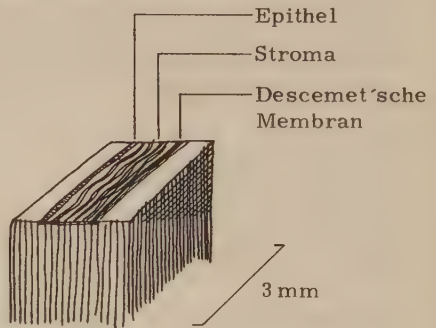


Abb. 24

Abb. 23/24. Der Zylinder wird zu einem Block von ca. $3 \times 2 \times 2$ mm Größe verkleinert. Die Hornhaut liegt dabei parallel zu den Längskanten dicht unter der Blockoberfläche.

Der Block wird in einen Blockhalter gespannt und unter der Stereo-Optik des Ultramikrotoms bei 50-facher Vergrößerung zu einer Pyramide getrimmt (Abb. 25). Die Pyramidenspitze wird dabei parallelogrammartig zugeschnitten. Die Descemet'sche Membran liegt parallel zu den Längskanten. Wegen der geringen Abmessungen des Parallelogramms muß die anteriore Hornhauthälfte entfernt werden (Abb. 26).

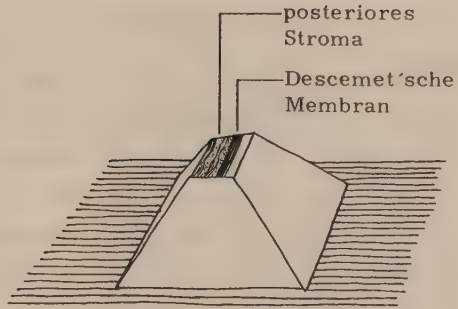
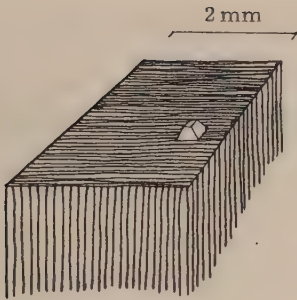


Abb. 25

Abb. 26

Abb. 25/26. Aus dem Block wird unter Sicht im Stereomikroskop des Ultramikrotoms eine Pyramide getrimmt. Die Pyramidenspitze wird als Parallelogramm zugeschnitten. Dabei liegt die Descemet'sche Membran parallel zu den Längskanten. Die anteriore Hälfte der Hornhaut ist entfernt.

Ultradünnschnitt: Mit dem Ultramikrotom werden vom Präparat in der Pyramidenspitze ca. 50 nm dünne Schnitte hergestellt (Abb. 27). Dazu wird ein Diamantmesser benutzt, das mit einer Wasserwanne versehen ist. Auf der Wasseroberfläche werden die einzelnen Schnitte aufgefangen. Sie schieben sich zu einer Kette zusammen, die mit einem Netz aufgenommen wird (Abb. 28). Das Netz dient als Präparatsträger für die Elektronenmikroskopie.

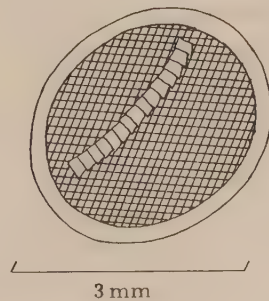
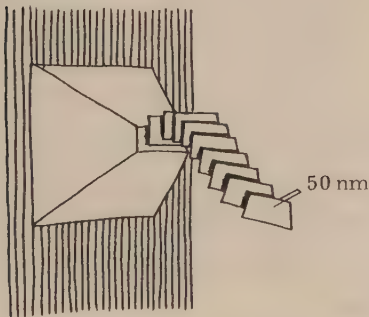


Abb. 27

Abb. 28

Abb. 27/28. Von der Descemet'schen Membran in der Pyramidenspitze werden mit dem Ultramikrotom Dünnschnitte (50 nm) hergestellt. Die Schnitte lagern sich zu einer Kette zusammen, die mit einem Netz von der Wasseroberfläche des Diamantmessers aufgenommen wird.

3. 2. 4. Elektronenmikroskopie

In der letzten Phase des Versuch werden die Präparate elektronenmikroskopisch untersucht. Als Gerät wird ein Transmissions-Elektronenmikroskop "EM 9" der Firma Zeiss verwendet.

Die Präparatkette wird zuerst bei Übersichts-Vergrößerungsstufe 1 ($\times 1.800$) systematisch abgefahren. Interessante Bereiche werden auf Stufe 2 ($\times 4.600$) oder Stufe 3 ($\times 9.500$) vergrößert und fotografiert. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel gezeigt. Unter den Fotos ist die Vergrößerung angegeben, bei der je nach Format des abgezogenen Positivs ein zusätzlicher Vergrößerungsfaktor berücksichtigt werden muß.

4. ERGEBNISSE

4. 1. LICHTMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE

Einige Präparate aus jeder Versuchsreihe werden nach der Entwässerung eingedeckelt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Abb. 29 und 30 zeigen Reaktionspräparate. Deutlich stellt sich die Descemet'sche Membran als gleichmäßig über die ganze Breite dunkelbraun gefärbtes Band dar. Die aus der Routine-Elektronenmikroskopie bekannte bilaminäre Struktur aus geordneten und amorphen Anteilen (s. S. 10) ist nicht nachweisbar. Infolge der Verwendung unfixierten Materials ist das Endothel bei den meisten Präparaten nicht erhalten.

Im Stroma von Reaktions- und Kontrollpräparaten sind in Randbereichen der Schnitte und an Artefakten Anfärbungen zu beobachten. Wir nehmen daher an, daß alterierte, stromale Randbereiche eine erhöhte Affinität für unspezifische Reaktionen haben. Außerdem zeigen Keratozyten in Reaktions- und Kontrollpräparaten z. T. Anfärbungen.

Die Abb. 31 zeigt eine Negativkontrolle, bei der O-Serum angewendet wurde. Abb. 32 stellt eine weitere Negativkontrolle dar, bei der der Absorptionstest durchgeführt wurde. In beiden Präparaten ist die Descemet'sche Membran ungefärbt und kaum vom Stroma zu unterscheiden.



Abb. 29 (x650)

Abb. 30 (x550)

Abb. 29/30. Descemet'sche Membran (Reaktionspräparate). - Nach Anwendung der PAP-Methode mit Typ IV-Antikörpern und anschließender enzymatischer Reaktion zur Sichtbarmachung der Peroxidase, stellt sich die Descemet'sche Membran als durchgehend dunkelbraun gefärbtes Band dar. Im Stroma finden sich im Bereich von Keratozyten unspezifische Anfärbungen.



Abb. 31 (x550)

Abb. 32 (x550)

Abb. 31/32. Descemet'sche Membran (Negativkontrollen). - Bei beiden Präparaten wurden Negativkontrollen durchgeführt. In Abb. 31 wurde O-Serum benutzt, in Abb. 32 wurde der Absorptionstest angewendet. Die Descemet'sche Membran stellt sich in beiden Kontrollen ungefärbt dar und ist vom ebenfalls ungefärbten Stroma kaum zu unterscheiden.

4. 2. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ERGEBNISSE

Die elektronenmikroskopischen Befunde werden in Abb. 33-41 wiedergegeben. Die Abb. 33-39 demonstrieren Reaktionsergebnisse, wie sie nach der Drei-Schritt-PAP-Methode mit Typ IV-Antikörpern, nach der enzymatischen Reaktion mit H_2O_2 und DAB und nach der Reaktion mit Osmiumsäure (zur elektronenmikroskopischen Darstellbarkeit der Reaktionen) in der Descemet'schen Membran zu finden sind. Die Reaktionsprodukte bestehen aus elektronendichten Granula, die bei einigen Präparaten über die ganze Breite der Descemet'schen Membran nachweisbar sind. Bei der überwiegenden Zahl der Präparate ist die Reaktionszone nur 1-2 μm breit am freien (endothelialen) Rand der Descemet'schen Membran zu finden. Innerhalb der Reaktionszone nimmt die Färbeintensität der Reaktionsgranula zum Stroma hin ab (Abb. 33-35). An Artefakten, die durch den Kryostatschnitt bedingt sind und erst im Elektronenmikroskop sichtbar werden, läßt sich ein besonderer Befund erheben: Die Randbereiche weisen Reaktionen auch in Tiefen auf, die in unbeschädigten Anteilen desselben Präparats ungefärbt sind (Abb. 33 und 34). Daraus kann gefolgert werden, daß für die Reaktionsträger (Antikörper/PAP-Komplexe) Penetrationsschwierigkeiten existieren (Davanger, 1977).

Die Reaktionsgranula haben einen Durchmesser von 20-40 nm und liegen damit größtmäßig etwa im Bereich der PAP-Komplexe. In einigen Granula lassen sich schwarze, punktförmige Anteile erkennen (Abb. 37 und 38), die als Substrukturen der PAP-Komplexe identifiziert werden können. Die Reaktionsgranula stellen damit die elektronenmikroskopisch sichtbar gemachten PAP-Komplexe dar (Sternberger, 1979; Pearse, 1981).

Bei der Mehrzahl der Präparate ist als Folge der Verwendung unfixierten Materials (s. S. 32) das Endothel nicht mehr vorhanden. Wir verzichteten auf die Fixierung, um die antigenen Eigenschaften des Collagens so wenig wie möglich zu beeinflussen.

Die in der Descemet'schen Membran nachweisbaren Reaktionsprodukte (PAP-Komplexe) zeigen Unterschiede in ihrer räumlichen Anordnung: In endothelnahen und mittleren Bereichen finden sich die PAP-Komplexe

in eher zufälliger, unregelmäßiger Verteilung – in stromanahen Bereichen zeigen sich die Granula z. T. regelmäßig, perlschnurartig aneinandergereiht. Die Aneinanderreihung vollzog sich dabei senkrecht zur Verlaufsrichtung der Descemet'schen Membran, so daß ein periodisches Reaktionsmuster entsteht (Abb. 36-39). Die Periodik stellt sich in einigen Präparaten besonders ausgeprägt dar und zeigt dabei Werte, die um 100 nm liegen (Abb. 39).

Als weitere Reaktionsergebnisse finden sich im Stroma einiger Präparate Fibrillen, die durch PAP-Komplexe im Abstand von ca. 100 nm markiert sind. Diese Periodik zeigt damit Werte, die nicht in der Größenordnung von interstitiellen Fibrillen (60-70 nm) liegen. In den übrigen Bereichen des Stromas sind keine Reaktionsprodukte zu finden.

Die Abb. 40 und 41 demonstrieren Präparate, bei denen Negativkontrollen durchgeführt wurden. Beim Präparat der Abb. 40 wurde der Absorptionstest angewendet, beim Präparat der Abb. 41 benutzten wir O-Serum (s. S. 26). In der Descemet'schen Membran der Kontrollschnitte sind in keinem Bereich die oben beschriebenen, typischen Reaktionsprodukte (PAP-Komplexe) nachweisbar.

Im stromanahen Bereich der Descemet'schen Membran in Abb. 41 finden sich vereinzelt osmiophile Granula, die in Färbintensität und Größe nicht mit den PAP-Komplexen vergleichbar sind. Es handelt sich hierbei um unspezifische Anfärbungen, die in diesem Bereich auch aus der Routine-Elektronenmikroskopie bekannt sind (s. S. 10).

In beiden Kontrollpräparaten sind die Endothelzellen stellenweise erhalten. Die Präparate stammen aus Versuchen, in denen eine Kurzfixierung mit 1 % Formalin für 5 min. durchgeführt wurde. In späteren Versuchen verzichteten wir auf die Fixierung, um alle Möglichkeiten der Beeinflussung der Antigenität soweit wie möglich auszuschließen.

In vielen Präparaten stellt sich die Descemet'sche Membran nicht in ihrer ganzen Breite, sondern im Anschnitt dar. Der Grund hierfür liegt in der nicht planen Einbettung des Präparats im Kunststoffblock und in der daraus resultierenden Schwierigkeit, beim Ulladünnschnitt genau in der Präparatebene zu schneiden (s. S. 44).

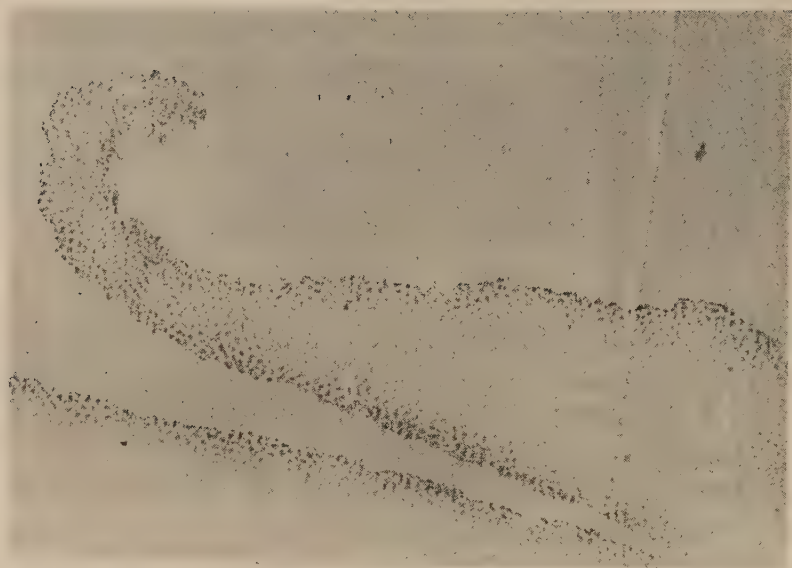


Abb. 33 (x14.500)

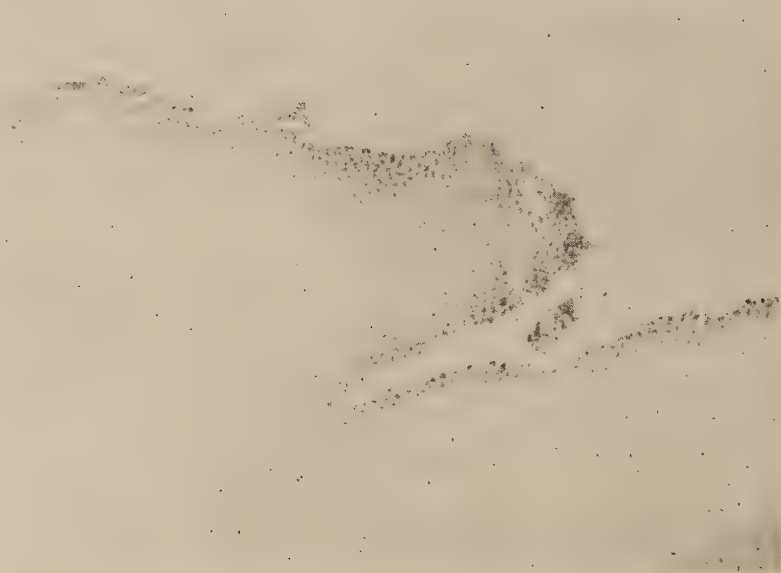


Abb. 34 (x14.500)

Abb. 33. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen an Artefakten in der Des-cemet'schen Membran. - An den Rändern der Artefakte (beim Kryostat-schnitt entstanden) zeigen sich Reaktionsprodukte auch in Bereichen, die sonst nicht reagieren. Dieser Befund zeigt die mögliche Beeinflussung der Reaktionsergebnisse durch Penetrationsschwierigkeiten für die Reaktions-träger (Antikörper/PAP-Komplexe).

Abb. 34. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen an Artefakten in der Des-cemet'schen Membran. - Wie in Abb. 33 stellen sich an den Rändern von Kryostat-Artefakten Reaktionsprodukte in sonst nicht reagierenden Berei-chen dar. Die PAP-Komplexe in der Reaktionszone zeigen keine bevorzug-te Anordnung.

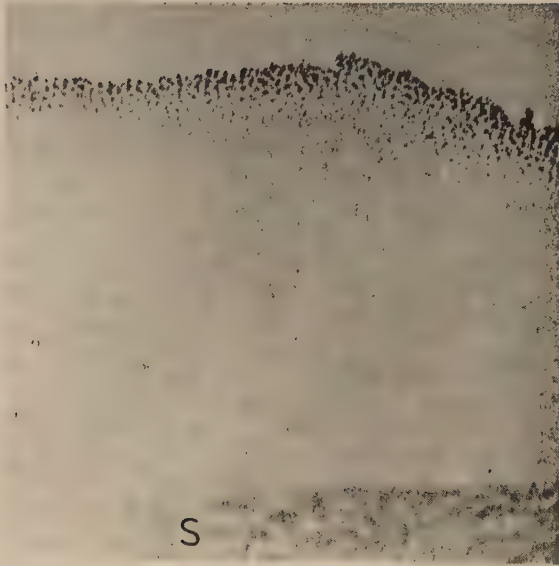


Abb. 35 (x 14.500)

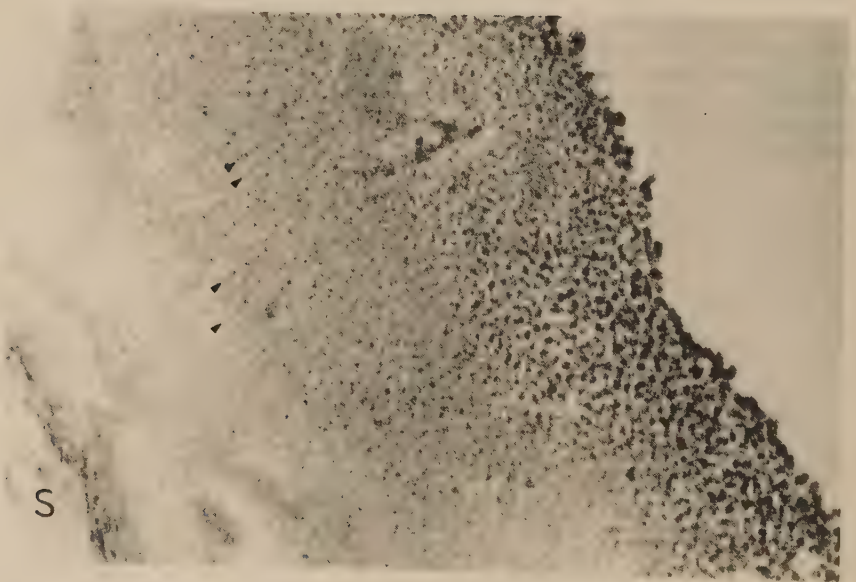


Abb. 36 (x 30.000)

Abb. 35. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen in der Descemet'schen Membran. - Die granulären Reaktionsprodukte (PAP-Komplexe) sind in diesem Präparat in einer nur ca. $0.7\mu\text{m}$ breiten Randzone der Descemet'schen Membran nachweisbar. Die zentraleren Anteile der Membran und das Stroma (S) zeigen keine Reaktionen.

Abb. 36. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen in der Descemet'schen Membran. - Im Präparat stellt sich ein ca. $4\mu\text{m}$ breiter Anschnitt der Descemet'schen Membran dar, der fast durchgehend mit Typ IV-Antikörpern reagiert hat. Die Färbeintensität der PAP-Komplexe nimmt vom Rand in Richtung Stroma (S) ab. Dagegen nimmt der Grad der Organisation der Granula zum Stroma hin scheinbar zu. Während am Präparatrand eine eher zufällige Verteilung vorherrscht, gibt es in stromanahen Anteilen Bereiche, in denen die PAP-Komplexe perlschnurartig aufgereiht erscheinen (kleine Pfeile). Es resultiert ein periodisches Reaktionsmuster. Die Routine-Elektronenmikroskopie zeigt in diesem Bereich ähnlich organisiertes, osmiophiles Material.



Abb. 37 (x 30.000)

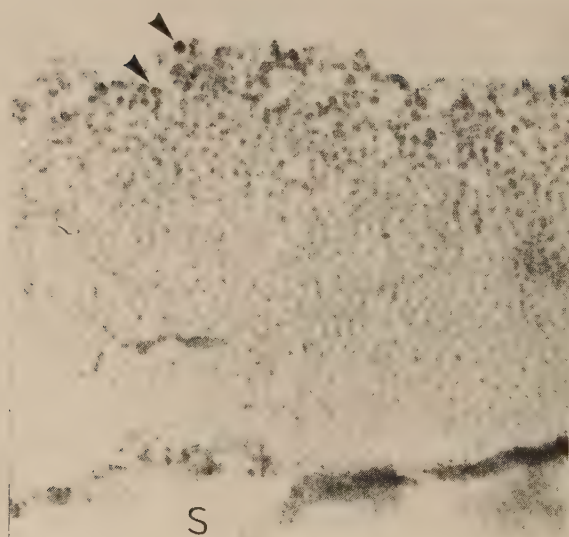


Abb. 38 (x 30.000)

Abb. 37. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen in der Descemet'schen Membran. - Im Anschnitt der Descemet'schen Membran stellen sich in der ganzen Breite Reaktionen mit Typ IV-Antikörpern dar. In stromnahen Bereichen ist eine periodische Organisation der PAP-Komplexe nachweisbar (kleine Pfeile). Das Stroma (S) zeigt keine Reaktionen.

Abb. 38. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen in der Descemet'schen Membran. - Das Präparat stammt aus derselben Versuchsreihe wie die Präparate aus Abb. 36 und 37. Der Schnitt ist jedoch dünner, so daß die PAP-Komplexe nicht so dicht gepackt wirken und sich schärfer darstellen. In einigen Komplexen kommen schwarze, punktförmige Substrukturen zur Darstellung (große Pfeile).

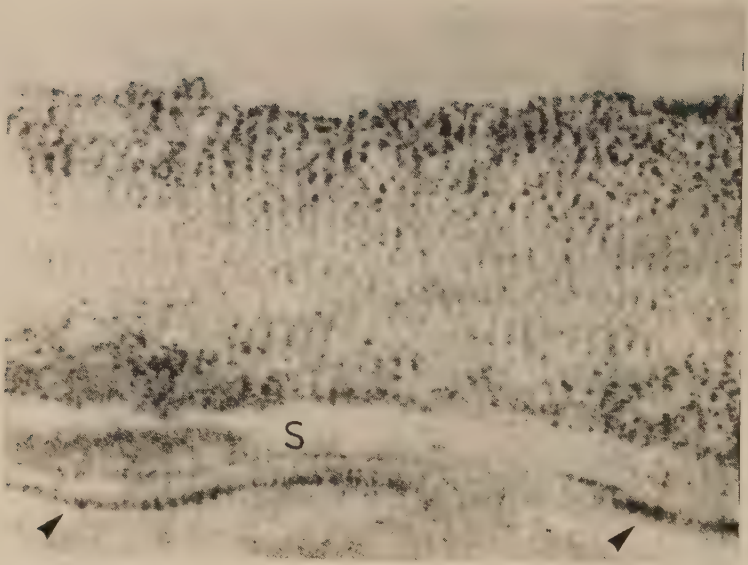


Abb. 39 (x 30.000)

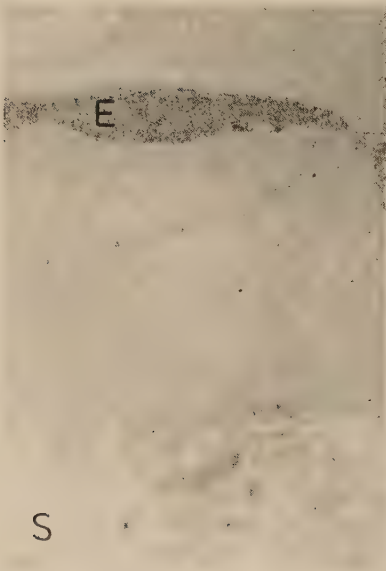


Abb. 40 (x 10.500)

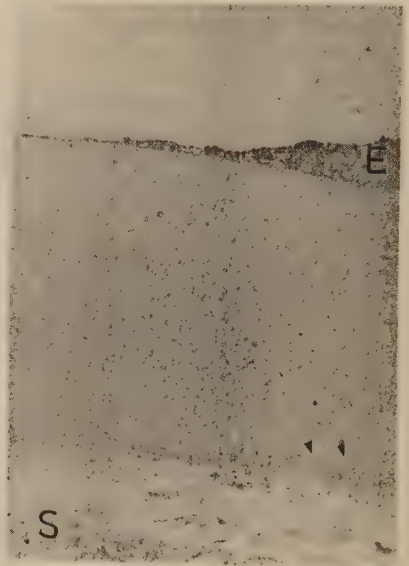


Abb. 41 (x 5.500)

Abb. 39. Verteilungsmuster von Typ IV-Collagen in der Descemet'schen Membran. - Das Präparat zeigt einen Anschnitt der Descemet'schen Membran, in dem sich die PAP-Komplexe perlschnurartig aneinandergereiht darstellen. Dadurch entsteht ein periodisches Reaktionsmuster, wie es die Abb. 36-38 z. T. schon aufweisen. Die Periodik beträgt ca. 100 nm und entspricht damit Werten, die auch routine-elektronenmikroskopisch an osmiophilen Anteilen in diesem Bereich gemessen werden können. Im Stroma (S) markieren PAP-Komplexe im Abstand von ca. 100 nm atypische Fibrillen (große Pfeile). Interstitielle Collagenfibrillen im Stroma zeigen keine Reaktionen.

Abb. 40. Descemet'sche Membran (Negativkontrolle). - Nach Durchführung des Absorptionstests (s. S. 26) stellt sich in keinem Bereich der Descemet'schen Membran eine Reaktion dar.

Abb. 41. Descemet'sche Membran (Negativkontrolle). - Nach Behandlung des Präparats mit O-Serum stellen sich in keinem Bereich der Descemet'schen Membran die typischen Reaktionsprodukte (PAP-Komplexe) dar.

Im stromanahen Bereich finden sich vereinzelt osmiophile Granula (kleine Pfeile), die in Größe und Färbintensität nicht den PAP-Komplexen entsprechen. Es handelt sich um unspezifische Anfärbungen, die in diesem Bereich auch mit der Routine-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden können.

In beiden Präparaten sind z. T. die Endothelzellen (E) vorhanden. Der Grund hierfür liegt in einer schwachen Fixierung des Gewebes. In späteren Versuchen wurde darauf völlig verzichtet, um jede Möglichkeit der Beeinflussung der Antigenität auszuschließen.

Obwohl sich die Abb. 40 und 41 um den Vergrößerungsfaktor Zwei unterscheiden, stellen sich die Descemet'schen Membranen etwa in gleicher Dicke dar. Das bestätigt die aus der Literatur bekannte Tatsache, daß bei den einzelnen Individuen große Variationsbreiten bestehen (Duke-Elder und Wybar, 1961).

5. DISKUSSION

Bei der Durchführung der Methode kam es bei einzelnen Versuchsschritten zu Schwierigkeiten, mit deren Diskussion das folgende Kapitel begonnen wird.

Die ersten Schwierigkeiten traten in Form des Abschwimmens der Präparate vom Thermanoxträger während der Inkubation mit Antikörpern und vor allem während der Spülvorgänge auf. Durch Überzug mit Cedukol konnte in den folgenden Versuchen die Hornhaut schwach an den Thermanoxträger fixiert und das Abschwimmen fast vollständig verhindert werden. Die Antigenität der Präparate wird nach unseren Erfahrungswerten durch die Behandlung mit Cedukol nicht beeinträchtigt. Dennoch ließ sich das Abheben der Hornhaut vom Thermanoxträger an einigen Stellen während der immunhistochemischen Behandlung nicht ganz verhindern. Das hatte zur Folge, daß die Schnitte nach ihrer Einbettung nicht plan im Kunststoff lagen und beim Ultradünnschnitt daher häufig schräg angeschnitten wurden. Eine Korrektur der Schnittebene war wegen der geringen Dicke des Präparats (10 μm) kaum möglich. Auch die Durchführung von Serienschnitten garantierte nicht, das Präparat in seiner ganzen Breite zu treffen. Die Descemet'sche Membran stellt sich aus diesem Grund in vielen Präparaten in Teilanschnitten dar (Abb. 42).

Bei allen Versuchen wurden als Objektträger von uns Thermanox-Kunststoffträger verwendet. Der Grund liegt darin, daß bei Benutzung von normalen Glasobjektträgern die Kunststoffblöcke sehr schlecht und meist nur unvollständig vom Glas gelöst werden konnten. Daher führten wir die Thermanox-Kunststoffträger ein, bei denen die Ablösung der Blöcke in den meisten Fällen problemlos gelang. Adhärente Thermanoxreste ließen sich nach Verkleinerung des Blocks leicht mit der Rasierklinge abheben oder mit dem Glasmesser beim Trimmen wegschneiden.

Als Reservoir für das Epoxidharz wurden von uns Kunststoffspritzen benutzt. Sie boten sich an, weil sie leicht bearbeitet und vollständig vom gehärteten Kunststoffblock gelöst werden konnten.

Insgesamt führten wir mit der in Kapitel 3 (s. S. 20) beschriebenen Me-

thode 15 Versuche mit jeweils 20 Präparaten (10 Reaktions- / 10 Kontrollpräparate) durch. Davon zeigten die Präparate eines Versuchs weder licht- noch elektronenmikroskopische Reaktionen. Bei 14 Versuchen stellten sich bei allen Reaktionspräparaten in der Descemet'schen Membran Reaktionen dar, die sich z. T. in ihrer Intensität unterschieden.

Das negative Ergebnis des einen Versuchs führen wir auf fehlerhafte Lagerung der Hornhaut zurück. Unter Luftabschluß bei -70°C kann sie mehrere Monate ohne Verlust ihrer antigenen Aktivität gelagert werden (nach eigenen Erfahrungen). Bei unzureichendem Luftabschluß trocknet das Gewebe jedoch aus und verliert seine Verwendungsfähigkeit. Wahrscheinlich hat dieser Vorgang bei der Hornhaut des negativen Versuchs stattgefunden.

Die Unterschiede in der Färbeintensität der Reaktionen können sich aus der fehlenden Standardisierung der enzymhistochemischen Reaktion zur Sichtbarmachung der Peroxidase ergeben. Diese Reaktion wird nach subjektiven, optischen Kriterien (Braunfärbung) abgebrochen und kann damit zu den beschriebenen Unterschieden führen.

Die Braunfärbung der Reaktionspräparate ist das erste Kriterium, den Erfolg eines Versuchs zu beurteilen. Unsere lichtmikroskopischen Ergebnisse sind in Abb. 29-32 dargestellt. Die Reaktionspräparate zeigen eine durchgehend dunkelbraun gefärbte Descemet'sche Membran. Ausbleibende Anfärbungen in Negativkontrollen und im Stroma (enthält interstitielles Typ I-Collagen) weisen die Spezifität der Reaktion mit Typ IV-Collagen nach.

Unser lichtmikroskopische Befund einer durchgehend reagierenden Descemet'schen Membran steht im Gegensatz zu einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit Typ IV-Antikörpern (Newsome et al., 1980; s. S. 12). Diese Untersuchung zeigte Reaktionen in anterioren und posterioren Anteilen unter Aussparung einer mittleren Zone. Zugleich steht diese Untersuchung im Widerspruch zur Vorstellung von einem Typ IV-Collagen-Gerüst als allgemeine Basalmembranen-Matrix (Timpl et al., 1981; s. S. 17). Unsere lichtmikroskopischen Ergebnisse stehen durch den Nachweis von Typ IV-Collagen in der gesamten Descemet'schen Membran im Ein-

vernehmen mit dieser Vorstellung.

Zur genaueren Untersuchung der unterschiedlichen Befunde wurde in unserer Arbeit die Elektronenmikroskopie herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 33-41 wiedergegeben. Es zeigen sich als Reaktionsergebnisse Granula, die als PAP-Komplexe identifiziert werden können. Während sich die Descemet'sche Membran in den lichtmikroskopischen Befunden meist durchgehend angefärbt darstellt, beträgt die Breite der Reaktionszone bei den elektronenmikroskopischen Befunden im Durchschnitt nur ca. 1-2 μm (die Descemet'sche Membran bei Erwachsenen ist im zentralen Bereich im Durchschnitt ca. 6 μm dick; s. S. 9). Gestützt durch den Nachweis von Reaktionen an Artefakten in sonst nicht reagierenden Bereichen (s. S. 34) folgerten wir, daß für die Reaktionsträger (Antikörper/PAP-Komplexe) Penetrationsschwierigkeiten existieren (Davanger, 1977).

Der Grund für unsere scheinbar unterschiedlichen licht- und elektronenmikroskopischen Befunde (durchgehende Reaktion – Randreaktion) liegt in der Schwierigkeit, die schmale Reaktionszone beim Ultradünnschnitt parallel anzuschneiden (Abb. 42). Die meisten elektronenmikroskopischen Befunde in unserer Arbeit zeigen daher einen Anschnitt der Randreaktionen.

Zur Verbreiterung der Reaktionszonen wurden verschiedene Möglichkeiten zur Verbesserung der Penetration erprobt. Um die mögliche Abhängigkeit der Penetration von der Zeit zu überprüfen, steigerten wir die Inkubationszeit bei den einzelnen Reaktionsschritten um das Vierfache auf 2 Stunden. Eine Änderung der Befunde konnte auf diese Weise nicht erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erleichterung der Penetration ist die Behandlung der Präparate mit CPC (Cetylpyridinium-Chlorid) (Davanger, 1977). CPC führt zur Präzipitation der Seitenketten der Proteoglykane, die als Basalmembranenbestandteile für die Oberflächenladung verantwortlich sind. Eine Umkehrung der Ladungsverhältnisse an der Präparatoberfläche soll den Penetrationswiderstand des Gewebes verringern. Als Ergebnis der CPC-Behandlung stellt sich lichtmikroskopisch eine sehr intensiv gefärbte Descemet'sche Membran dar. Elektronenmikroskopisch

zeigt sich eine im Durchschnitt 3-4 μm breite Reaktionszone aus PAP-Komplexen. Trotz der Steigerung kann eine durchgehende Reaktion nicht erreicht werden.

Eine möglicherweise erfolgversprechende Methode zur Überwindung dieses Problems ist die immunhistochemische Behandlung der Präparate nach Einbettung und Ultradünnschnitt. Diese "postembedding"-Methode hat den Vorteil, daß Penetrationsschwierigkeiten bei Verwendung ultradünner Schnitte praktisch ohne Bedeutung sind. An der Realisierung der Methode mit unseren Präparaten (menschliche Hornhaut) wird z. Z. noch gearbeitet.

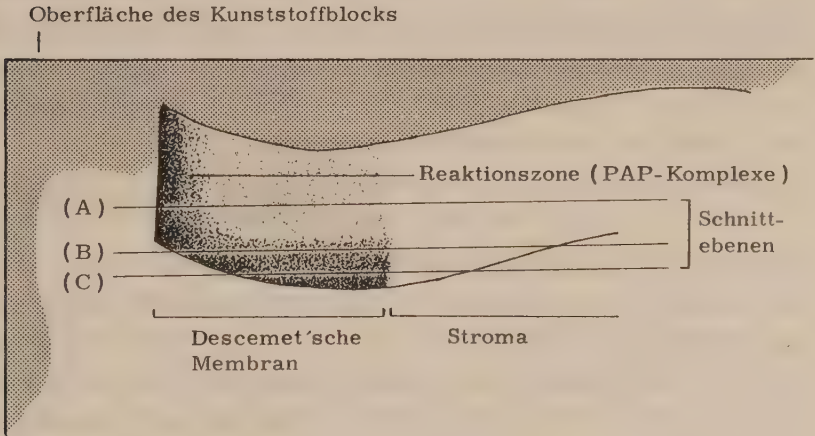


Abb. 42. Schematische Darstellung des im Kunststoffblock eingebetteten Präparats (Sagittalschnitt) mit einigen beim Serien-Ultradünnschnitt möglichen Schnittebenen. Das Endothel ist nicht erhalten. - Da für die Reaktionsträger (Antikörper/PAP-Komplexe) Penetrationsgrenzen existieren, zeigen sich die Reaktionsprodukte nur am Präparatrand und an der ehemaligen Oberfläche (liegt durch Einbettung jetzt unten im Block). Lichtmikroskopisch entsteht der Eindruck einer vollständig reagierenden Descemet'schen Membran. Elektronenmikroskopisch zeigt sich nach Ultradünnschnitten im oberen Präparatbereich nur die Randreaktion (A). Durch die nicht plane Lage des Präparats wird die durchgehende Reaktionszone nur selten annähernd parallel angeschnitten (B). Oft zeigen die Ultradünnschnitte im unteren Bereich die Descemet'sche Membran nur im Anschnitt (C).

Die elektronenmikroskopischen Befunde gestatten trotz der nur schmalen Reaktionszone den Schluß, daß die Descemet'sche Membran in ihrer ganzen Breite mit Typ IV-Antikörpern reagieren kann. Unser lichtmikroskopische Befund wird durch die Elektronenmikroskopie verifiziert: Typ IV-Collagen ist als collagener Baustein in der gesamten Descemet'schen Membran vorhanden, quantitative Verteilungsunterschiede können nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Vorstellung, daß Typ IV-Collagen die Grundstruktur in Basalmembranen bildet. Die postulierte netzartige Verknüpfung der Collagenmoleküle innerhalb der Matrix (Timpl et al., 1981) ist ebenfalls gut mit den mechanischen Eigenschaften der Descemet'schen Membran (s. S. 17) vereinbar. Trotz dieser guten Übereinstimmungen ist unsere Methode nicht in der Lage, das tatsächliche Verknüpfungsmuster der Moleküle in der Matrix nachzuweisen. Von der Netzstruktur abweichende Matrixmodelle sind ebenso nicht auszuschließen, wie die Möglichkeit, daß innerhalb der Basalmembran verschiedene Matrices nebeneinander existieren.

Die letzte Überlegung hat für die Diskussion eine besondere Bedeutung, da die PAP-Komplexe in der Descemet'schen Membran verschiedene Organisationsformen aufweisen. Während sich die PAP-Komplexe in endothelnahen und mittleren Bereichen der Descemet'schen Membran eher zufällig geordnet darstellen, zeigen sie im stromanahen Drittel stellenweise eine periodische Ordnung (die Periodik entspricht nicht dem typischen 60-70 nm-Wert für interstitielles Collagen). Das könnte bedeuten, daß die collagene Matrix im stromanahen Bereich anders organisiert ist als in den übrigen Anteilen. Interessanterweise lassen sich mit der unspezifischen Routine-Elektronenmikroskopie im stromanahen Drittel osmiophile Anteile mit ähnlicher Periodik nachweisen, während die übrigen Anteile eine amorphe Struktur zeigen (s. S. 10). Die Vorstellung von verschiedenen Matrices in der menschlichen Descemet'schen Membran steht im Gegensatz zu strukturellen Untersuchungen an Rinderhornhäuten (s. S. 11). Dort zeigte sich in der gesamten Descemet'schen Membran eine gleichförmige Gitterstruktur (Sawada, 1982). Genauere Aussagen bleiben weiteren Studien vorbehalten (z. B. mit der "freeze-etching" Methode).

Mit der von uns benutzten Methode haben wir jedoch ein geeignetes Hilfsmittel in der Hand, um collagene Veränderungen in der Descemet'schen Membran nachzuweisen zu können:

Bei einer Reihe pathologischer Prozesse finden strukturelle Umbauvorgänge in der Descemet'schen Membran statt (s. S. 8). Die Methode wäre in der Lage, in diesen Strukturveränderungen eine mögliche Beteiligung der collagenen Typ IV-Komponente aufzuzeigen. Collagenveränderungen könnten in Relation zu den pathologischen Prozessen gesetzt werden. Auch die normale, altersphysiologische Zunahme des sagittalen Durchmessers der Descemet'schen Membran (s. S. 9) könnte nach Einflüssen collagener Veränderungen untersucht werden.

Neben der in unserer Arbeit durchgeführten grundsätzlichen Untersuchung der Verteilung von Typ IV-Collagen eröffnet die Methode damit die Perspektive, wichtige Ergebnisse zu einer Reihe spezieller Aufgabenstellungen liefern zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

An der Descemet'schen Membran menschlicher Hornhäute wird zur Darstellung der collagenen Komponente die Drei-Schritt-PAP-Methode mit Typ IV-Antikörpern angewendet. Die Reaktionsergebnisse werden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei stellt sich die Descemet'sche Membran nach enzymatischer Färbung lichtmikroskopisch als gleichmäßig dunkelbraun gefärbtes Band dar. Nach Behandlung mit Osmiumsäure sind elektronenmikroskopisch in allen Bereichen der Descemet'schen Membran Reaktionen (PAP-Komplexe) nachweisbar. Die stromanahen Anteile zeigen ein periodisches Reaktionsmuster, während die Reaktionsprodukte in den übrigen Bereichen eine eher zufällige Verteilung aufweisen. Der Nachweis von Typ IV-Collagen in der gesamten Descemet'schen Membran zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Modell einer collagenen Basalmembranen-Matrix.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ALITALO, K. ; VAHERI, A. ; KRIEG, T. ; TIMPL, R. :
Biosynthesis of two subunits of type IV procollagen and of other basement membrane proteins by a human tumor cell line.
Eur. J. Biochem. , 109 (247-255), 1980.
- 2 BORNSTEIN, P. :
Structurally distinct collagen types.
Annu. Rev. Biochem. , 49 (957-1003), 1980.
- 3 CARLSON, E. C. ; MEEZAN, E. ; BRENDDEL, K. ; KENNEY, M. C. :
Ultrastructural analysis of control and enzymetreated isolated renal basement membranes.
Anat. Rec. , 200 (421-436), 1981.
- 4 CHAPMAN, J. A. :
The staining pattern of collagen fibrils - I. An analysis of electron micrographs.
Connect. Tissue Res. , 2 (137-150), 1974.
- 5 CRAIG, A. S. ; PARRY, D. A. D. :
Collagen fibrils of the vertebrate corneal stroma.
J. Ultrastruc. Res. , 74 (232-239), 1981.
- 6 CROUCH, E. ; SAGE, H. ; BORNSTEIN, P. :
Structural basis for apparent heterogeneity of collagens in human basement membranes: Typ IV procollagen contains two distinct chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77/2 (745-749), 1980.
- 7 DAICKER, B. :
Gewebliche Diskontinuitätszonen in der gesunden und pathologisch veränderten menschlichen Descemet'schen Membran.
Ophthalmologica, 161 (166-174), 1970.
- 8 DAVANGER, M. :
On the molecular composition and physico-chemical properties of the pseudo-exfoliation material.
Acta. Ophthalmol. , 55 (621-633), 1977.
- 9 DAVISON, P. F. ; CANNON, D. J. :
Heterogeneity of collagens from basement membranes of lens and cornea.
Exp. Eye. Res. , 25 (129-137), 1977.

- 10 DIXIT, S. N. :
Type IV collagens - Isolation and characterization of two structurally distinct collagen chains from bovine kidney cortices.
Eur. J. Biochem. , 106 (563-570), 1980.
- 11 DIXIT, S. N. ; STUART, J. M. ; SEYER, J. M. ; RISTELLI, J. ; TIMPL, R. ; KANG, A. H. :
Type IV collagens: Isolation and characterization of 7S collagen from human kidney, liver and lung.
Coll. Relat. Res. , 1 (549-556), 1981.
- 12 DUANCE, V. C. ; BAILEY, A. J. :
The nature, structure and function of the vascular basement membrane. In: Biochemical interactions at the endothelium, (41-78);
Cryer, A. (Hrsg.), Elsevier Science Publishers, 1983.
- 13 DUKE-ELDER, SIR S. ; LEIGH, A. G. :
Diseases of the outer eye - Part 2. In: System of ophthalmology - Vol. VIII; Duke-Elder, Sir S. (Hrsg.), Kimpton, London 1965.
- 14 DUKE-ELDER, SIR S. ; WYBAR, K. C. :
The anatomy of the visual system. In: System of ophthalmology - Vol. II; Duke-Elder, Sir S. (Hrsg.), Kimpton, London 1961.
- 15 FEHÉR, J. ; VALU, L. :
Über die Struktur der Descemet'schen Membran.
Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. , 179 (65-73), 1969.
- 16 FESSLER, L. I. ; FESSLER, J. H. :
Identification of the carboxyl peptides of mouse procollagen IV and its implication for the assembly and structure of basement membrane procollagen.
J. Biol. Chem. , 257 (9804-9810), 1982.
- 17 FOIDART, J.-M. ; TRYGGVASON, K. ; GEHRON ROBEY, P. ; LIOTTA, L. A. ; MARTIN, G. R. :
Biosynthesis of type IV and V (α A - α B) collagens by human placenta.
Coll. Relat. Res. , 1 (137-150), 1981.
- 18 FREEMAN, I. L. ; VERGNES, J.-P. ; BROWN, S. I. :
Age-related biochemical changes in human Descemet's membrane.
Gerontology, 26 (217-220), 1980.
- 19 FURTHMAYR, H. ; MADRI, J. A. :
Rotary shadowing of connective tissue macromolecules.
Coll. Relat. Res. , 2 (349-363), 1982.

- 20 GLANVILLE, R. W. ; RAUTER, A. ; FIETZEK, P. P. :
Isolation and characterization of a native placental basement membrane collagen and its component α chains.
Eur. J. Biochem. , 95 (383-389), 1979.
- 21 GLANVILLE, R. W. ; RAUTER, A. :
Pepsin fragments of human placental basement membrane collagens showing interrupted triple-helical amino acid sequences.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. , 362 (943-951), 1981.
- 22 GOKEL, J. M. ; HÜBNER, G. :
Intracellular "fibrous long spacing" collagen in Morbus Dupuytren (Dupuytren's contracture).
Beitr. Path. , 161 (176-186), 1977.
- 23 GRAYSON, M. :
Diseases of the cornea.
The C. V. Mosby Company, St. Louis, 1979.
- 24 GUILLAUMIN, E. A. ; FUJIKAWA, L. S. ; VASTINE, D. W. ; FOSTER, C. S. ; COLVIN, R. B. :
Basement membrane components in normal human corneas from various age groups.
Annual Spring Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology Incorporated, Sarasota, Fla. , USA, May 2-7, 1982.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. , 22/3 (72), 1982.
- 25 HAY, E. :
Development of the vertebrate cornea.
Int. Rev. Cytol. , (263-322), 1980.
- 26 JAKUS, M. A. :
Ocular fine structure - Selected electron micrographs.
Churchill, London, 1964.
- 27 KAMIYAMA, R. :
Fibrous long spacing-like fibers in the bone marrow of myeloproliferative disorder.
Virchows Arch. (Cell. Path.), 39/3 (285-291), 1982.
- 28 KEFALIDES, N. A. :
Structure and biosynthesis of basement membranes.
Int. Rev. Connect. Tissue Res. , 6 (63-104), 1973.
- 29 KEFALIDES, N. A. :
Basement membranes: Structural and biosynthetic considerations.
J. Invest. Dermatol. , 65 (85-92), 1975.

- 30 KEFALIDES, N. A. :
Basement membranes : Current concepts of structure and synthesis.
Dermatologica, 150 (4-15), 1979.
- 31 KEFALIDES, N. A. ; ALPER, R. ; CLARK, C. C. :
Biochemistry and metabolism of basement membranes.
Int. Rev. Cytol., 61 (167-228), 1979.
- 32 KENNEY, M. C. ; BENYA, P. D. ; NIMNI, M. E. ; SMITH, R. E. :
A new technique for isolation of Desemet's membrane : Preliminary studies.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 18/5 (527-532), 1979.
- 33 KLINGEMANN, H.-G. :
Fibronectin - Klinische und biologische Aspekte.
Deut. med. Wochenschr., 107 (1361-1365), 1982.
- 34 KÜHN, K. ; WIEDEMANN, H. ; TIMPL, R. ; RISTELI, J. ; DIERINGER, H. ;
VOSS, T. ; GLANVILLE, R. W. :
Macromolecular structure of basement membrane collagens - Identification of 7S collagen as a crosslinking domain of typ IV collagen.
FEBS Lett., 125/1 (123-128), 1981.
- 35 KÜHN, K. :
Segment-long-spacing crystallites, a powerful tool in collagen research.
Coll. Relat. Res., 2 (61-80), 1982.
- 36 KUMAMOTO, C. A. ; FESSLER, J. H. :
Biosynthesis of A, B procollagen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77/11 (6434-6438), 1980.
- 37 LAURIE, G. W. ; LEBLOND, C. P. ; COURNIL, I. ; MARTIN, G. R. :
Immunohistochemical evidence for the intracellular formation of basement membrane collagen (type IV) in developing tissues.
J. Histochem. Cytochem., 28/12 (1267-1274).
- 38 MINOR, R. R. :
Collagen metabolism.
Am. J. Pathol., 98/1 (228-280), 1980.
- 39 MOCZAR, M. ; MOCZAR, E. :
Biochemical aspects of the maturation of corneal stroma and Desemet's membrane.
Arch. Ophthalmol. (Paris), 35/1 (83-90), 1975.

- 40 NEWSOME, D. A. ; FOIDART, J. - M. ; HASSEL, J. R. ; KRACHMER, J. H. ; RODRIGUES, M. M. ; KATZ, S. I. :
Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. , 18/5 (738-750), 1981.
- 41 PEARSE, A. :
Histochemistry.
Churchill, London, 1981.
- 42 RISTELLI, J. ; SCHUPPAN, D. ; GLANVILLE, R. W. ; TIMPL, R. :
Immunochemical distinction between two different chains of two type IV collagen.
Biochem. J. , 191 (517-522), 1980.
- 43 RISTELLI, J. ; BÄCHINGER, H. P. ; ENGEL, J. ; FURTHMAYR, H. ; TIMPL, R. :
7-S collagen: Characterization of an unusual basement membrane structure.
Eur. J. Biochem. , 108 (239-250), 1980.
- 44 RISTELLI, J. ; WICK, G. ; TIMPL, R. :
Immunological characterization of the 7-S domain of type IV collagens.
Coll. Relat. Res. , 5 (419-432), 1981.
- 45 SAGE, H. ; WOODBURY, R. G. ; BORNSTEIN, P. :
Structural studies on human type IV collagen.
J. Biol. Chem. , 254 (9893-9900), 1979.
- 46 SAGE, H. :
Collagens of basement membranes.
J. Invest. Dermatol. , 79 (51s-59s), 1982.
- 47 SAWADA, H. :
The fine structure of the bovine Descemet's membrane with special reference to biochemical nature.
Cell Tissue Res. , 226/2 (241-256), 1982.
- 48 SCHRECK, E. :
Die Gefäßhaut (Uvea). In: Lehrbuch und Atlas der Augenheilkunde (287-337); Axenfeld, T. ; Pau, H. (Hrsg.), Fischer, Stuttgart, 1980.
- 49 SCHUPPAN, D. ; TIMPL, R. ; GLANVILLE, R. W. :
Discontinuities in the triple helical sequence Gly-X-Y of basement membrane (type IV) collagen.
FEBS Lett. , 115/2 (297-300), 1980.

- 50 SCHWARTZ, D. ; VEIS, A. :
Characterization of basement membrane collagen of bovine anterior lens capsule via segment-long-spacing crystallites and the specific cleavage of the collagen by pepsin.
FEBS Lett. , 85/2 (326-332), 1978.
- 51 SCHWARTZ, D. ; VEIS, A. :
Characterization of bovine anterior-lens-capsule basement membrane collagen - 2. Segment-long-spacing precipitates: Further evidence for large N-terminal and C-terminal extensions.
Eur. J. Biochem. , 103 (29-37), 1980.
- 52 STERNBERGER, L. A. :
Immunocytochemistry.
Wiley, New York, 1979.
- 53 TANZER, M. L. ; WAITE, J. H. :
Collagen cross-linking.
Coll. Relat. Res. , 2 (177-180), 1980.
- 54 TERRANOVA, V. P. ; ROHRBACH, D. H. ; MARTIN, G. R. :
Role of laminin in attachment of PAM 212 (epithel cells) to basement membrane collagen.
Cell, 22 (719-726), 1980.
- 55 TIMPL, R. ; GLANVILLE, R. W. ; WICK, G. ; MARTIN, G. R. :
Immunochemical study on basement membrane (type IV) collagens.
Immunology, 38 (109-116), 1979.
- 56 TIMPL, R. ; ROHDE, H. ; GEHRON ROBEY, P. ; RENNARD, S. I. ; FOI-DART, J.-M. ; MARTIN, G. R. :
Laminin-A glycoprotein from basement membranes.
J. Biol. Chem. , 254/19 (9933-9937), 1979.
- 57 TIMPL, R. ; WIEDEMANN, H. ; VAN DELDEN, V. ; FURTHMAYR, H. ; KÜHN, K. :
A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes.
Eur. J. Biochem. , 120 (203-211), 1981.
- 58 TRÜB, B. ; GRÖBLI, B. ; SPIESS, M. ; ODERMATT, B. F. ; WINTERHALTER, K. H. :
Basement membrane (type IV) collagen is a heteropolymer.
J. Biol. Chem. , 257/9 (5239-5245), 1982.
- 59 TRYGGVASON, K. ; GEHRON ROBEY, P. ; MARTIN, G. R. :
Biosynthesis of type IV procollagens.
Biochemistry, 19 (1284-1289), 1980.

- 60 TSENG, S. C. G. ; SMUCKLER, D. ; STERN, R. :
Comparison of collagen types in adult and fetal bovine corneas.
J. Biol. Chem. 257/5 (2627-2633), 1982.
- 61 WARING, G. O. :
Posterior collagenous layer of the cornea - Ultrastructural classification of abnormal collagenous tissue posterior to Descemet's membrane in 30 cases.
Arch. Ophthalmol. , 100 (122-134), 1982.

LEBENS LAUF

- 1956 geboren am 1. August in Berlin als erster Sohn des Werkzeug-
machers Günther Kern und seiner Ehefrau, der Textilreinigungs-
meisterin Annemarie Kern, geb. Thonke
- 1963 Einschulung in die Hansa-Grundschule in Berlin
- 1965 Schulwechsel in die Christoph-Ruden-Grundschule (Berlin)
- 1967 Schulwechsel in die Silberstein-Grundschule (Berlin)
- 1969 Schulwechsel in die Albert-Schweitzer-Oberschule (Berlin)
- 1975 Abschluß der Schulzeit mit der Reifeprüfung
- 1976 zum Sommersemester Studienbeginn im Fach Medizin an der
Freien Universität Berlin
- 1978 Abschluß des Grundstudiums mit dem Physikum
- 1982 Abschluß des klinischen Studiums mit dem 3. Staatsexamen
- 1983 am 25. Januar Erlangung der Approbation

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Tiburtius für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung sowie Herrn Dr. J. P. Harnisch für seine engagierte Betreuung und viele konstruktive Gespräche.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Frau R. Buchen für ihre unermüdliche Hilfe bei allen labortechnischen Fragen und bei Herrn Dr. P. K. Sinha für viele wichtige Hinweise.

